

Progesteronbestimmung in der Milch

Rainer Hamburger

1974

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus dem Institut für Physiologie
der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft Weihenstephan
der Technischen Universität München

Direktor: Professor Dr. Heinrich Karg

Progesteronbestimmung in der Milch

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München



von

Rainer Hamburger
aus Franzheim
b. Freising

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme

Referent: Prof. Dr. H. Karg

Korreferent: Prof. Dr. M. Rüsse

Tag der Promotion: 26.7.1974



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Vorbemerkung.....	1
2. Literaturteil.....	2
2.1. Biochemische Angaben zum Progesteron....	2
2.1.1. Chemische Struktur.....	2
2.1.2. Biosynthese.....	3
2.1.3. Stoffwechsel.....	4
2.2. Progesteronproduzierende Organe unter besonderer Berücksichtigung des Rindes..	5
2.2.1. Corpus luteum.....	5
2.2.2. Plazenta.....	7
2.2.3. Nebennierenrinde.....	8
2.2.4. Fragliche Bedeutung der Milchdrüse	8
2.3. Biologische Bedeutung von Progesteron unter besonderer Berücksichtigung des Rindes.....	8
2.3.1. Biologische Bedeutung während des Zyklus.....	8
2.3.2. Biologische Bedeutung während der Gravidität.....	9
2.3.3. Biologische Bedeutung für die Mammogenese, Laktogenese und Galaktopoes.....	10
2.4. Vorkommen von endogenen Hormonen in der Milch.....	12
2.4.1. Östrogene und Androgene.....	12
2.4.2. Gestagene.....	18
2.4.3. Corticoide.....	19

	Seite
3. Methodischer Teil.....	21
3.1. Auswahl des Progesteronbestimmungs- verfahrens.....	21
3.2. Angewandtes Bestimmungsverfahren.....	24
3.2.1. Prinzip der radioimmunologischen Progesteronbestimmung.....	27
3.2.2. Extraktionsverfahren zur Progesteronbestimmung.....	27
3.2.2.1. Extraktion von Pro- gesteron aus Plasma.....	27
3.2.2.2. Extraktion von Pro- gesteron aus Milch.....	29
3.2.2.2.1. Vorversuche zur Extraktion von Progesteron aus Milch....	29
3.2.2.2.2. Vorversuche zur weiteren Reinigung des Erstextraktes aus Milch....	38
3.2.2.2.3. Endgültiger Ex- traktions- und Reinigungsgang mit Bestimmung der Extraktions- ausbeute.....	43
3.2.3. Durchführung des Radioimmunotests zur Bestimmung von Progesteron in Plasma und Milch.....	46
3.2.3.1. Charakterisierung der verwendeten Antisera....	46
3.2.3.1.1. Bestimmung der Bindungskapazi- tät.....	47

3.2.3.1.2. Überprüfung auf Kreuzreaktionen	48
3.2.3.2. Durchführung und Auswertung der Proteinbindungsreaktion	51
3.2.4. Überprüfung der Zuverlässigkeits- kriterien.....	54
3.3. Weiterentwicklung der beschriebenen Methodik zu einem Routineverfahren.....	59
3.3.1. Konservierung der Milchproben.....	60
3.3.2. Versuche zur Kürzung des Extraktions- ganges und zur rationellen Test- auswertung.....	63
3.4. Besondere Materialien und Reagenzien.....	64
3.5. Bestimmung des Fettgehaltes der Milch.....	66
3.6. Tiermaterial, Probennahmen und Versuchsplan.	66
4. Ergebnisteil.....	68
4.1. Progesteronkonzentrationen in Plasma und Milch von Kühen während Zyklus und Frühgravidität.....	68
4.1.1. Untersuchungen von Nachgemelks- proben und Plasma.....	68
4.1.2. Untersuchungen von Gesamtgemelks- proben und Plasma.....	85
4.2. Bestimmung der Progesteronkonzentrationen zum Frühträchtigkeitsnachweis im Rahmen eines ersten Feldversuches.....	87
4.3. Korrelationen zwischen Progesterongehalt und Fettgehalt der Milch.....	92
4.3.1. Veränderungen der Progesteronkon- zentrationen und des Fettgehaltes in der Milch während des Melkvorganges..	92
4.3.2. Beziehungen zwischen Progesteronkon- zentrationen und Fettgehalt in Milch- proben während Zyklus und Früh- trächtigkeit.....	95

4.3.3. Verlauf der Progesteronkonzentration im MilCHFett einer Kuh während eines Zyklus.....	101
4.4. Bestimmung der Progesteronausscheidung über die Milch bei Kühen mit unterschiedlicher Milchleistung.....	103
4.5. Bestimmung von Progesteron in Einzelmelken zum Nachweis der Frühgravidität.....	104
4.6. Progesterongehalte in handelsüblichen Milchprodukten.....	104
5. Diskussion.....	109
5.1. zur Methode.....	109
5.2. zu den physiologischen Ergebnissen und der praktischen Anwendung.....	110
5.3. zur Bestimmung der Progesteronkonzentrationen in Milch und Milchprodukten als Lebensmittel.....	116
6. Zusammenfassung - Summary.....	118
7. Tabellenanhang.....	122
8. Literaturverzeichnis.....	150
9. Lebenslauf	

1. V o r b e m e r k u n g

Das Hormon Progesteron nimmt im Fortpflanzungs-
geschehen eine zentrale Stellung ein. Es wird beim
Rind nicht nur während des Brunstzyklus sondern
auch während der Gravidität fast ausschließlich
vom Gelbkörper produziert. Es hat sich gezeigt,
daß seine Bestimmung im Blutplasma stets Rück-
schlüsse auf die Ovarfunktion zuläßt.

Nachdem inzwischen auch das Vorkommen von Pro-
gesteron in der Milch vom Rind bewiesen wurde,
sollte mit vorliegender Arbeit untersucht werden,
inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Corpus
luteum Funktion und der Progesteronkonzentration in
der Milch besteht.

Letztlich sollte gezeigt werden, ob es - ähnlich wie
bei Blutplasma - auch bei gezielter Verwendung von
Milch gelingt, mit Hilfe der Progesteronbestimmung einen
Trächtigkeitsnachweis zu erbringen. Damit wäre es
erstmalig bei einfacher Probennahme möglich, bei einer
größeren Tierpopulation den Fertilitätszustand zu
kontrollieren.

2. Literaturteil

2.1. Biochemische Angaben zum Progesteron

2.1.1. Chemische Struktur

Die Gruppe der hormonalen Steroide leitet sich in ihrer chemischen Struktur vom Steran (Cyclopentanoperhydrophenantren) ab. Je nach Anzahl der C-Atome im Molekül lassen sich die Steroidhormone in drei Gruppen einteilen:

1. Die Östrogene mit 18 Kohlenstoff-Atomen und einem phenolischen A-Ring als Charakteristikum
2. Die Androgene mit 19 Kohlenstoff-Atomen
3. Die Gestagene und Corticoide mit 21 Kohlenstoff-Atomen

Die wohl wichtigste biologische Schlüsselsubstanz aus der Gruppe der Gestagene ist das Progesteron. Es wurde erstmals von Butenandt und Mitarbeitern 1934 isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt. Die chemische Struktur von Progesteron ist in Abb. 1 dargestellt.

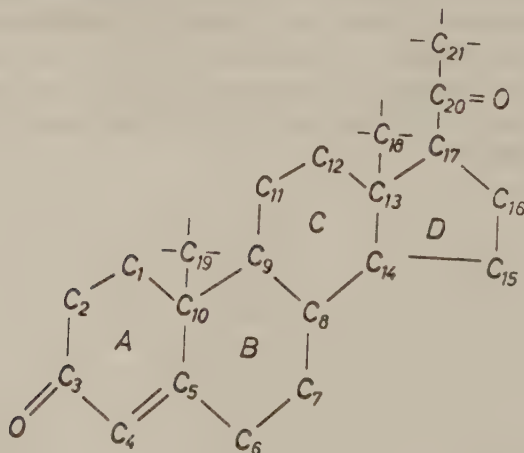


Abb. 1 Struktur des Progesterons (Numerierung der Kohlenstoffatome und Bezeichnung der Ringe)

Das Molekül ist durch die beiden Ketogruppen an Kohlenstoffatom Nr.3 und Nr.20, sowie durch die Doppelbindung in dem damit ungesättigten A-Ring zwischen C4 und C5 charakterisiert (Karlson 1970).

2.1.2. Biosynthese

Die Biosynthese nimmt ihren Ausgang vom Acetyl-Co A (aktivierte Essigsäure), aus dem über eine Reihe von Zwischenstufen (Mevalonsäure, Isopentylpyrophosphat, Farnesylpyrophosphat, Squalen, Lanosterin) das Cholesterin entsteht. Die oxydative Verkürzung der Cholesterinseitenkette geschieht durch Hydroxylierung an C 20 und C 22 und Abspaltung der Restkette als Isocapronaldehyd, wobei Pregnenolon entsteht. Durch Dehydrierung entsteht schließlich die biologisch wichtige Schlüsselsubstanz Progesteron (Shimizu et al. 1960, Miller & Turner 1963, Karlson 1970). Die Biosynthese anderer Sexualhormone und der Corticoide baut auf dieser Substanz auf (Eik-nes & Hall 1962, Weliky & Engel 1962, Dorfmann & Ungar 1965, Karlson 1970). Die Biosynthese und die zentrale Stellung bzw. Schlüsselfunktion von Progesteron bei der Biosynthese anderer Steroidhormone sind in Abb. 2 dargestellt.

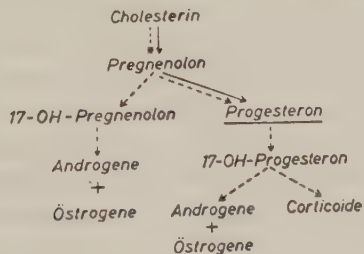


Abb. 2 Biosynthese von Progesteron und dessen zentrale Stellung bei der Synthese anderer Steroidhormone

2.1.3. Stoffwechsel

Das Hormon wird von den Progesteron produzierenden Zellen direkt in die Blutbahn abgegeben (inkretorische Sekretion). Das Vorhandensein spezifischer Plasmaproteine im Blut beeinflusst den weiteren Stoffwechsel von Progesteron erheblich (Westphal 1971). Es handelt sich dabei um bestimmte Globuline, denen neben einer reinen Vehikelfunktion auch eine funktionell regulative Bedeutung zukommt. Die Eigenschaften dieser Proteine weisen gewisse speziesbedingte quantitative Unterschiede auf, insbesondere ist aber ihre Konzentration von physiologischen und pathologischen Zuständen (Alter, Geschlecht, Gravidität, durchgeführte Therapien) abhängig (Westphal 1971); Billiar et al. (1969) konnten in einem in vitro Ansatz nachweisen, daß bei Anwesenheit von Human-Cortico-Steroid Binding Globuline und Human - Serum - Albumin Progesteron von 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase enzymatisch nicht angegriffen werden konnte. Ebenso erwies sich an Protein gebundenes Progesteron im biologischen Mäuseuterustest als wirkungslos (Westphal & Forbes 1963). Durch die Bindung des Steroids an das Protein kommt es also einmal zu einer Verminderung der biologischen Aktivität des Steroidhormones, gleichzeitig wird aber das Steroidhormon seinerseits im Organismus vor enzymatischen Abbauvorgängen, besonders in der Leber, geschützt. Auch die Adsorption an Blutgefäßwände und andere Oberflächenstrukturen wird durch die Bindung an Proteine vermindert. Der Steroid-Protein-Komplex ist aber auch eine Art Reservoir, in dem verhältnismäßig große Hormonmengen angelagert werden können, ohne biologisch wirksam zu werden (Westphal 1971). Die Verstoffwechselung von Progesteron findet größtenteils in der Leber durch Reduktion der beiden Ketogruppen des Moleküls, bzw. einer Hydrierung des A-Ringes statt (Hayano et al. 1956).

Die Ausscheidung der Abbauprodukte geht grÖßtenteils über die Niere von-statten.Im Rinderharn wurde von Haraszti et al. (1968) 5 β -Pregnan-3 α und 20 α -diol als Hauptprodukt des Progesteronabbaues isoliert und eine Abhängigkeit der Ausscheidungsmengen vom Zyklusstadium beobachtet.

2.2. Progesteron produzierende Organe unter besonderer Berücksichtigung des Rindes

2.2.1. Corpus luteum

Das Corpus luteum periodicum ist bei allen Säugetier-spezies während des Zyklus der nahezu ausschließliche Produzent für Progesteron.Es hat beim Rind eine durchschnittliche Lebensdauer von 17,3 Tagen,berechnet nach Angaben von Hoffmann (1972).

Während der ersten beiden Tage nach dem Östrus liegen bei beginnendem Aufbau des Gelbkörpers die Progesteron-werte sehr niedrig,steigen dann bis zum Erreichen des Blütestadiums des Corpus luteum allmählich auf Höchst-werte (ca. 10 ng/ml Plasma) an,um ungefähr 48 Stunden vor der nächsten Brunst,verbunden mit einer raschen Rückbildung des Gelbkörpergewebes,sehr steil abzu-fallen (Hoffmann 1972, Hoffmann et al. 1973).

Die Phase der Progesteronproduktion im Corpus luteum ist gekennzeichnet durch eine sehr starke Durch-blutung des zugehörigen Ovars und hier wieder speziell des Gelbkörpers,die am Ende der Lutealphase signifikant abfällt.So berichten Niswender et al. (1973) über Ver-suche bei Schafen,wo vom 12. bis 16. Zyklustag 89 % bis 97 % der gesamten ovariellen Blutversorgung zum Gelbkörper geht.

Die Dauer des Zyklus,errechnet aus 58 Zyklen von ver-schiedenen Tieren bei denen die Plasmaprogesteron-werte bestimmt worden waren und in den meisten Fällen

die Ovulation durch rektale Palpation kontrolliert wurde, beträgt im Durchschnitt 20,7 Tage mit einer Standardabweichung von $\pm 1,4$ Tagen. (Die zugrundegelegten Daten wurden aus Arbeiten von Ender 1974, Hoffmann 1972 und den eigenen Versuchsergebnissen entnommen).

Während der Trächtigkeit trägt der Gelbkörper die Bezeichnung Corpus luteum graviditatis und ist bei Ratte (Johnson & Challans 1930), Kaninchen (Fraenkel & Kohn 1902), Ziege (Meites et al. 1951, Heap & Linzell 1965) und Schwein (Du Mesnil Du Buisson & Dauzier 1957, Short 1960, Spies et al. 1960) in dieser Zeit die wichtigste Progesteronquelle. Beim Schaf ist die Gelbkörperfunktion für die Aufrechterhaltung der Gravidität nur in der Zeit vor dem 55. Trächtigkeitstag entscheidend (Neher & Zarrow 1954, Denamur & Martinet 1955, Lindner et al. 1964, Deane et al. 1966, Linzell & Heap 1968); trotzdem produziert aber das Corpus luteum graviditatis auch nach dieser Zeit Progesteron (Edgar & Ronaldson 1958, Lindner et al. 1964).

Ähnlich sind die Beobachtungen bei der Frau, wo das Corpus luteum nur bis zum 40. Schwangerschaftstag die Hauptprogesteronquelle darstellt (Venning 1957, Asdell 1964).

Bei der Stute degeneriert das eigentliche Corpus luteum graviditatis etwa am 35. Tag der Trächtigkeit. Um diese Zeit bilden sich aber aus den Ovarien schubartig Follikel nach, die zu sog. Corpora lutea auxiliaria umgewandelt werden (Amoroso 1948) und dann bis zu Beginn ihrer Degeneration ab dem 150. Trächtigkeitstag eine ergiebige Progesteronquelle darstellen (Cole & Saunders 1935, Cole & Goss 1943, Clegg et al. 1954, Jöchle 1957).

Beim Rind zeigen die Untersuchungsergebnisse der letzten Jahre, daß das Corpus luteum graviditatis

für die gesamte Trächtigkeitsdauer die hauptsächlichste Progesteronquelle darstellt. So kontrollierten Wagner et al. (1974) die Progesteronwerte bei einem Versuch der glucocorticoidinduzierten Geburt mittels simultaner Blutentnahme aus der Jugular-, Uterus- und Uterus-Ovar-Vene. Die weitaus höchsten Progesteronwerte wurden im Blut der Uterus-Ovar-Vene gemessen; die Konzentrationen im Blut der Uterusvene lagen bedeutend niedriger, sogar noch etwas unter denen des peripheren Blutes aus der Vena Jugularis

2.2.2. Plazenta

Der Plazenta als endokrinem Organ kommt insofern eine Sonderstellung zu, als sie nur während der Gravidität vorhanden und auch während dieser Zeit einem ständigen Strukturwandel mit Größenzunahme unterworfen ist. In diesem Zeitraum produziert die Plazenta bei einigen Spezies Progesteron, das bisher nur aus dem Plazentagewebe der Frau (Diczfalusy 1952, Pearlman & Cerceo 1952), des Schafes (Short & Moore 1959) und der Stute (Short 1957) isoliert werden konnte. Bei diesen Spezies ist die Plazenta bereits ab dem ersten Drittel der Gravidität an der Progesteronsynthese beteiligt und übernimmt nach einer gewissen Übergangsphase als wichtigste Progesteronquelle die Verantwortung für den Fortbestand der Trächtigkeit.

Frühere Spekulationen, daß die Plazenta des Rindes vor allem in der letzten Phase der Gravidität an der Produktion von Progesteron beteiligt sein könnte (Bowerman & Melampy 1962, Stabenfeldt et al. 1970) sind durch die oben bereits zitierten Arbeiten von Wagner et al. (1974) hinfällig geworden.

2.2.3. Nebennierenrinde

Bei der Hauptfunktion der Nebennierenrinde, der Synthese und Inkretion von Mineralo- und Glucocorticoiden (Turner 1966), tritt als unvermeidbare Ausgangs- und Zwischenstufe Progesteron auf (Karlson 1970). Progesteron konnte aus der Nebenniere von Rind (Balfour et al. 1957, Gorski et al. 1958, Short 1960, Stormshak & Erb 1961), Schaf (Balfour et al. 1957, Short & Moore 1959), Schwein (Balfour et al. 1957) und Mensch (Zander 1960) isoliert werden. Stott & Robinson (1970) berichteten über eine erhöhte Progesteronkonzentration im Kreislauf beim Hitzestress in Versuchen beim Rind. Über eine Erhöhung des Progesteronspiegels im Blut nach einer ACTH-Verabreichung berichteten Wagner et al. (1972).

2.2.4. Fragliche Bedeutung der Milchdrüse

Die Fähigkeit des Eutergewebes, Progesteron zu synthetisieren wurde 1973 von Heap et al. zur Diskussion gestellt. Slotin & Heap (1970) berichteten nach Versuchen mit Ziegen, daß das Eutergewebe in der Lage ist, aus injiziertem ^3H -Pregnenolon teilweise ^3H -Progesteron zu bilden. Die Arbeitsgruppe folgerte aus diesem Versuchsergebnis, daß Eutergewebe aufgrund einer beträchtlichen Enzymaktivität zur Synthese von Steroidhormonen befähigt ist. Auch Heap et al. (1973) vermuteten für das Rind eine aktive Progesteronbiosynthese im Eutergewebe. Eine endgültige Aussage hierzu liegt jedoch noch nicht vor.

2.3. Biologische Bedeutung von Progesteron unter besonderer Berücksichtigung des Rindes.

2.3.1. Biologische Bedeutung während des Zyklus

In Wechselbeziehung zu den Östrogenen haben die

Gestagene an allen wichtigen Stellen des Genitaltraktes für die Fortpflanzung entscheidende Bedeutung. Ihre Wirkung entfaltet sich an Cervix, Uterus und Eileiter und ist z.B. an der Steuerung ihrer Sekretion und Motilität beteiligt. Es kommt zu einer Transformation der Uterusschleimhaut von der Proliferationsphase, die durch ein östrogeninduziertes Uterindrüsenwachstum gekennzeichnet ist, in die Sekretionsphase, in der Differenzierungsvorgänge im Endometrium überwiegen. Dieser Einfluß der Gestagene zeigt sich beim Rind ca. am 5. Tag des Zyklus und äußert sich in einer verstärkten Sekretion der Uterindrüsen und anschließender Herabsetzung des Tonus der Uterusmuskulatur.

Des weiteren wird durch Rückkopplungsvorgänge auf das hypothalamisch-hypophysäre Zentrum nach Anstieg des Progesteronspiegels im peripheren Blut zwar eine Follikelanbildung nicht verhindert, aber es kommt, wie Höfer (1973) anhand von Versuchen mit Gn-RH (Gonadotropin-Releasing-Hormone) zeigen konnte, zu keiner Ovulation; Ovulationen konnten in diesen Versuchen mit Gn-RH in der Regel nur ausgelöst werden, wenn die Progesteronkonzentrationen im Blut unter 1,0 ng Progesteron / ml lagen.

Bei nicht stattgehabter Konzeption kommt es nach Abfall der Progesteronkonzentration im Blut zwischen den Tagen 18 bis 21 des Zyklus (Karg et al. 1969, Pope et al. 1969, Stabenfeldt et al. 1969, Hoffmann 1972, Hoffmann et al. 1973) durch Auslösung des negativen Rückkopplungs-Mechanismus zu einer erneuten Ausschüttung von LH und zur Ovulation, womit das zyklische Geschehen erneut beginnt (Hansel & Snook 1970, Karg et al. 1970 a,b).

2.3.2. Biologische Bedeutung während der Gravidität

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben ist, wird erst durch Umstellung in die Sekretionsphase eine

Nidation ermöglicht. Für die weitere Aufrechterhaltung der eingetretenen Gravidität ist eine fortdauernde Progesteronsekretion notwendig, wofür - je nach Spezies - das Corpus luteum und/oder die Plazenta verantwortlich sind (s. Kap. 2.2.). Ein wichtiger Punkt für die Progesteronbiosynthese zu Beginn der Trächtigkeit ist die Weiterführung der Funktion des Corpus luteum nach dem Tag 16, was allgemein als "Umstellung" vom Corpus luteum periodicum zum Corpus luteum graviditatis bezeichnet wird. Dazu muß der sog. luteolytische Faktor, der für den Abbau des Corpus luteum periodicum ab dem 16. Tag des Zyklus verantwortlich ist, ausgeschaltet werden.

Über die Bedeutung der Progesteron produzierenden Organe während der Trächtigkeit des Rindes wurde bereits in Kap. 2.2. hingewiesen. Danach kann für diese Spezies gesagt werden, daß die Funktionsfähigkeit des Corpus luteum für die Gesamtdauer der Gravidität notwendig ist. So stellten Estergreen et al. (1967) fest, daß auf eine Entfernung der Ovarien bis zum 200. Tag der Trächtigkeit stets ein Abort erfolgte. Bei Ovariectomie nach diesem Zeitpunkt treten vermehrt verkürzte Tragezeiten, Totgeburten, abnorme Geburtsverläufe und Retentiones secundinarum auf.

2.3.3. Biologische Bedeutung für die Mammogenese, Laktogenese und Galaktopoese

Nach der noch heute geläufigen Lehrbuchmeinung wird angenommen, daß die Ovarhormone (Östrogene und Progesteron) die eigentlichen die Mammogenese beeinflussenden Faktoren sind. Dies ergab sich aus Substitutionsversuchen bei weiblichen kastrierten Rindern und Ziegen, in denen gezeigt werden konnte, daß eine Östrogenzufuhr - allerdings nur in Verbindung mit Progesteron - eine vollständige tubulo-

alveoläre Differenzierung bewirken würde; Östrogene allein verursachten nur eine Ausbildung des Ductus-systems im Drüsengewebe (Folley 1952, 1956, Steinbeck 1969). Es zeigte sich jedoch, daß die nach einer solchen exogenen Östrogen- und Gestagenzufuhr entwickelten Euter stets eine geringere Milchleistung aufwiesen als die Kontrollen (Sykes & Wrenn 1951, Yamamoto & Turner 1955, Turner et al. 1956, Sud et al. 1968).

Wesentlich neue Gesichtspunkte ergaben Untersuchungen von Cowie et al. (1965). In diesen Versuchen wurde ovariectomierten juvenilen Ziegen 150 Tage lang eine optimale Dosierung von Östrogenen und Progesteron verabreicht, wonach eine Euterhälfte entfernt wurde. Danach wurden die Tiere regelmäßig gemolken. Auf dem Laktationshöhepunkt wurde die zweite Euterhälfte entfernt. Ein histologischer Vergleich zeigte, daß erst durch den Melkvorgang eine volle Ausbildung des tubuloalveolären Systems bewirkt wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse gaben die Autoren als auslösenden Faktor für die Mammogenese den Melkreiz an.

Weiterhin konnten Cowie et al. (1968) zeigen, daß juvenile, ovariectomierte Ziegen auch ohne Zufuhr von Östrogenen und Progesteron nur durch zweimalige Melkversuche täglich zur Entwicklung und Funktion der Milchdrüse gebracht werden konnten. Nach Durchtrennung des Hypophysenstiels blieb dieser Effekt aus. Daraus schlossen sie, daß dem Hypothalamus-Hypophysen-System ein maßgeblicher Anteil für die Entwicklung der Milchdrüse zukommt. Dies bestätigte sich in Versuchen, wo nach alleiniger parenteraler Verabreichung von Östrogenen und Progesteron an ovariectomierte und hypophysektomierte Ziegen das tubuloalveoläre Wachstum ausblieb und erst bei zusätzlicher Injektion von Prolaktin, Wachstumshormon und ACTH eintrat (Cowie et al. 1966).

Im Hinblick auf die Galaktopoese muß also unter den Hormonen, die den laktogenen Komplex bilden, dem Pro-

laktin und Wachstumshormon eine primäre, dem Progesteron dagegen eine sekundäre Rolle zugeschrieben werden (Cowie et al. 1966, Schams 1972).

Der Schlüsselreiz für das Einsetzen der Laktogenese (Milchbildung und Sekretion in den Alveolen) könnte der Abfall der Progesteronkonzentration im Blut in den letzten Tagen der Gravidität (Pope et al. 1969, Hoffmann & Karg 1969, Stabenfeldt et al. 1970, Hoffmann et al. 1973) in Wechselbeziehung zu dem plötzlichen Abfall des Östrogenspiegels in der Plazenta unmittelbar zum Geburtszeitpunkt sein (Erb et al. 1968, Robinson et al. 1970, Hoffmann 1972).

Schams (1972) macht allerdings auch hier von den Hormonen des laktogenen Komplexes wieder die gleichzeitig mit der Geburt aktivierten Hypophysenhormone für das Einsetzen der Laktogenese verantwortlich.

Für die Aufrechterhaltung einer bereits in Gang gekommenen Laktation - der Galaktopoese - kann dem Progesteron keine Bedeutung zugeschrieben werden (Schams 1972).

2.4. Vorkommen von endogenen Hormonen in der Milch

2.4.1. Östrogene und Androgene

Ratsimamanga et al. (1956, 1961) und Ferrando et al. (1960) untersuchten den Einfluß von Hormonen in der Kuhmilch auf die Entwicklung des Organismus und die Funktion der innersekretorischen Drüsen bei infantilen Ratten und stellten dabei fest, daß die tägliche orale Verabreichung von handelsüblicher pasteurisierter Milch eine den Östrogenen vergleichbare Wirkung hervorrief; dies waren früherer Eintritt der Geschlechtsreife sowie Gewichtszunahme des Genitaltraktes beim weiblichen Tier und Gewichtsverluste der Hoden und der

Hypophysen bei männlichen Tieren.

1952 bestimmten Pope und Roy mit Hilfe des Mäuseuterustests die Östrogenaktivität im Kolostrum und im Blut der Frau und der Kuh. Sie fanden, daß die Östrogene im Kolostrum hauptsächlich in der wässrigen Phase als Konjugate vorlagen und die gemessene biologische Aktivität der des Blutes entsprach. Umgerechnet ergaben sich 5,2 µg Östradiol-17β pro 1 Milch.

Münch (1954) untersuchte die Ausscheidung von Androgenen und Östrogenen in der Kuhmilch. Als Androgennachweis wurde der Kükenkammtest herangezogen, der Allen-Doisy-Test für die Östrogenbestimmung. Eine Ausscheidung von Androgenen war nicht festzustellen. Dagegen zeigte sich während des Zyklus ein zweimaliger Östrogenanstieg und zwar am Tag 12 und am Tag 18 des Zyklus. Während der Trächtigkeit stellte er ein stufenweises Ansteigen der Östrogenaktivität mit jeweils gleichbleibenden Konzentrationen vom 2. bis 5. und 6. bis 8. Monat der Gravidität fest.

Turner (1956) stellte Versuche zur Bestimmung des Östrogengehaltes in der Milch nicht tragender und tragender Kühe an unter Verwendung des Mäuseuterustests bei oraler Verabreichung der Testsubstanz. Gegenüber den Kontrolltieren nahm das Gewicht der Uteri bei Verfütterung von handelsüblicher Milch um ca. 100 %, bei Milch von trächtigen Kühen um zwischen 100 und 400 % zu. Bei Verfütterung von Milch nicht trächtiger Kühe erzielte er keine Zunahme.

Nach Untersuchungen von Vogt et al. (1969) und Kolich & Gass (1971) ist die Bewertung von Angaben über die Östrogenkonzentrationen in Milch und Milchprodukten, die mit Hilfe des Mäuseuterustests nach oraler Verabreichung dieser Substanzen ermittelt wurden, mit Vorsicht vorzunehmen, da nutritiv bedingte uterotrope Wirkungen auftreten können, die auch bei Gabe östrogenfreier Fette festgestellt wurden.

Mit einer fluorimetrischen Methode bestimmte Ittrich (1960) die Östrogene in Kolostralmilch und Muttermilch von Frauen, wobei zwischen Östron, Östradiol-17 β und Östriol differenziert wurde. Als klares Ergebnis zeigte sich ein Östrogenabfall mit der Dauer der Laktation, wie in Tab. 1 dargestellt ist (Angaben in μg / 100 ml Milch).

Tab. 1 Östrogenkonzentrationen in μg / 100 ml in Muttermilch von zwei Frauen (F1/F2) nach Ittrich 1960

	Östron		Östradiol		Östriol	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2
1. Laktationstag	0,85	0,30	0,30	0,20	2,30	2,20
2. Laktationstag	0,18	0,08	0,15	0,03	0,36	0,30
3. Laktationstag	0,13	0,06	0,07	0,02	0,16	0,13

Lunaas (1963, 1964) berichtet über das Vorkommen von endogenen Östrogenen in der Milch der Kuh, wobei zur quantitativen Bestimmung eine spektrofluorimetrische Messung durchgeführt wurde. Unterteilt wurden die Östrogene in eine ätherlösliche (freie) und eine nicht ätherlösliche (konjugierte) Fraktion. Den in der Tabelle 2 angegebenen Östrogenwerten liegen die von Lunaas (1963, 1964) angegebenen Zahlen zugrunde. Die höchsten Konzentrationen wurden im Kolostrum gemessen; dann folgte - besonders bei Messung der konjugierten Östrogene - ein Abfall der Konzentration bis zum 3. Melken. Sehr niedrige Werte wurden bei nicht trächtigen Tieren gefunden. Die absolut höchsten Werte für freie als auch konjugierte Östrogene ergaben sich für Östron; für Östradiol-17 β lagen sie etwas niedriger, während Östradiol-17 α nur in geringen Mengen gemessen wurde. Bei nicht trächtigen Tieren waren diese Unterschiede nicht gegeben.

Tab. 2 Östron und Östradiol in freier und konjugierter Form in
Kolostrum und Milch des Rindes in μg pro 1000ml
(nach Lunaas 1963, 1964)

	n	Östrogene					
		Frei			Konjugiert		
		Mittelwert ($\pm$ s)			Mittelwert ($\pm$ s)		
		E ₁	E ₂ -17 β	E ₂ -17a	E ₁	E ₂ -17 β	E ₂ -17a
1. Milchentnahme	5	3,55 (1,76)	3,11 (3,40)	0,37 (0,22)	6,04 (1,73)	3,73 (1,07)	0,44 (0,32)
2. Milchentnahme	5	2,06 (2,19)	2,18 (2,48)	0,22 (0,07)	2,65 (0,64)	1,75 (0,50)	0,34 (0,03)
3. Milchentnahme	2	3,53	1,68	0,27	2,45	1,02	0,11
Normale Milch einer nicht trächtigen Kuh	1	0,04	0,12	-	0,03	0,15	-

(E₁ = Östron , E₂ = Östradiol)

Chiccini (1966) untersuchte die Konzentrationen von Östradiol-17 β und Östron im Blut und in der Milch nymphomaner Kühe und von solchen mit normalem Zyklus. Angewandt wurde die Extraktionsmethode von Ittrich (1960), die quantitative Messung wurde spektrophotometrisch nach Kober (1931) durchgeführt. Bei normalen Tieren schwankten die Werte für Östradiol-17 β zwischen 0,25 und 0,80 μg / 100 ml Milch im Östrus und zwischen 0,27 und 0,48 μg / 100 ml Milch im Metöstrus. Die entsprechenden Werte für Östron lagen bei 1,85 bis 4,63 μg / 100 ml Milch während des Östrus und 0,92 bis 1,08 μg / 100 ml Milch während des Metöstrus. Die nymphomanen Kühe zeigten während des Höhepunktes der Brunst Werte von 0,35 bis 0,85 μg Östradiol-17 β pro 100 ml Milch und 1,85 bis 4,30 μg Östron pro 100 ml Milch; gegen Ende der Brunst wurden 0,30 bis 0,50 μg Östradiol-17 β pro 100 ml Milch und 1,10 bis 2,80 μg Östron pro 100 ml Milch gemessen.

Mit einer Doppelisotopen-Derivat-Verdünnungsmethode, der eine hohe Empfindlichkeit und Spezifität zugeschrieben werden kann (Hoffmann 1972), bestimmten Monval-Gerondeau et al. (1970) Östron (E_1), Östradiol-17 β ($E_{2\beta}$), Östradiol-17a (E_{2a}), sowie Östriol (E_3) in Milch und Milchprodukten des Rindes. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ihrer Untersuchungen zeigt die Tabelle 3.

Wie die bisher zitierten anderen Autoren haben auch Monval-Gerondeau et al. im Kolostrum die höchsten Konzentrationen an Östrogenen gemessen, wobei wiederum Östron mengenmäßig an erster Stelle stand. Im Gegensatz zu Lunaas (1963, 1964) ergaben sich jedoch für Östradiol-17 β und Östradiol-17a Werte in gleichen Größenordnungen. Monval-Gerondeau et al. (1970) gelang es erstmals, in handelsüblichen Milchprodukten Östrogene nachzuweisen.

Tab. 3 Östrogene in Milch und Milchprodukten
(nach Monval-Gerondeau et al. 1970)

	n	E ₁	E _{2β}	E _{2α}	E ₃
		ng pro 100 ml bzw. 100 g			
Kolostrum					
Färsen A	5	152	21	40	6,5
1. Melken					
Kolostrum					
Färsen B	4	194	74	-	4,7
1. Melken					
Rohmilch					
3 Monate	6	8,6	1,1	-	3,8
a.p.					
Handelsübl.					
past. Milch	10	3,1	1,0	-	3,7
Handelsübl.					
past. Milch	4	7,8	3,0	6,3	-
teilweise					
entfettetes	4	2,8	0,5	0,7	6,5
Milchpulver					

Darling & Harkness (1973) beschreiben eine Methode zur Gruppenanalyse für Steroide in der Milch. Der Arbeitsgang setzt sich aus Verseifung, sanfter mechanischer Extraktion, Oxydation mit CrO₃, Trennung mit Girard's Reagenz und Dünnschichtchromatographie der ketonischen Fraktion zusammen. Eine endgültige Auftrennung und Messung der Steroide wurde durch Gas-Flüssigkeits-Chromatographie durchgeführt. Angaben über gemessene Werte in der Milch von trächtigen und nicht trächtigen Kühen liegen nur für 5α-Androstan-3,17-dion vor; es wurde in einer mittleren Konzentration

von 0,54 ug pro 100 ml Milch ermittelt.

2.4.2. Gestagene

Williams (1962), der C¹⁴-markiertes Progesteron an Kühe parenteral verabreichte und anschließend Kot, Urin und Milch darauf untersuchte, schrieb aufgrund seiner Versuchsergebnisse wie folgt: "The extremely small recovery in milk indicates that milk is of no importance in the excretion of progesterone or its metabolites."

Dieser Befund wurde durch weitere Versuche jedoch eindeutig widerlegt.

So vermutete bereits 1963 McCracken aufgrund dünn-schichtchromatographischer Untersuchungen das Vorkommen von Progesteron in der Milch trächtiger Kühe.

Den endgültigen Beweis erbrachten Darling et al. (1972), die durch Analysen am Massenspektrometer das Vorkommen von Progesteron in der Milch trächtiger Kühe eindeutig nachweisen konnten. Gefunden wurden Konzentrationen zwischen 5 und 15 ng Progesteron pro ml Milch; als Ausgangsmenge wurden 50 ml Milch extrahiert.

Dem vorausgehend führten schon 1971 Laing & Heap erste Bestimmungen über die Dynamik der Progestagenausscheidung mit der Milch durch. Zur Anwendung kam eine Kompetitive Protein-Bindungs-Reaktion (CPB), wobei die Erstextraktion mit Petroläther durchgeführt wurde und die sich anschließende Entfettung durch Ausfrieren der Probe in 70 %-igem Methanol. Paralleluntersuchungen wurden im Plasma durchgeführt. Für Milch waren folgende Ergebnisse zu verzeichnen: Bei anöstrischen Kühen wurden durchschnittlich Progestagenkonzentrationen von 2,25 ($\pm$ 0,51) ng pro ml Milch ermittelt; für nicht trächtige und in verschiedenen Stadien des Zyklus stehende Tiere ergab

sich ein Durchschnittswert von 4,22 ($\pm$ 0,76) ng pro ml Milch. Höchstwerte um 18,55 ng pro ml Milch wurden bei trächtigen Kühen zwischen dem 35. und 83. Tag der Trächtigkeit gemessen. Gegen Ende der Trächtigkeit schienen die Werte abzufallen. Besondere Bedeutung messen die Autoren der hohen Gestagenkonzentration in der Milch während der Frühträchtigkeit zu. Nach ihrer Meinung ist dies auf eine erhöhte Abgabe von Progesteron aus dem Blut in die Milchdrüse während dieser Zeit zurückzuführen, oder bedingt durch in dieser Zeit in der Milch vorhandene Progesteronmetaboliten, welche die Kompetitive Protein-Bindungs-Reaktion stören. In weiterführenden Untersuchungen berichten Heap et al. (1973) unter dem Titel "Pregnancy diagnosis in cows" über die Progesteron- bzw. Progestagenkonzentrationen in Milch während Zyklus und Gravidität. Sie stellten fest, daß der Progesterongehalt in der Milch mindestens genauso hoch oder höher als im Plasma ist; das nachgewiesene Hormon bezeichneten sie jedoch als "Progestagen", da sie mit der unspezifischen Methode der Kompetitiven Protein-Bindungs-Reaktion, sowie bei Verwendung eines relativ unspezifischen Antiserums im Radioimmunotest stets höhere Meßwerte erhielten als bei Verwendung eines hochspezifischen Antiserums. Resultierend aus diesen Untersuchungen wird ein Frühgraviditätsnachweis für das Rind vorgeschlagen, der darauf beruht, Progesteron direkt in mit Puffer verdünnter Milch vom 20. bis 28. Tag nach der Insemination zu bestimmen. Bei Werten ab 7,0 ng Progesteron pro ml Milch wird auf eine bestehende Trächtigkeit geschlossen. Inwieweit diese Befunde mit den eigenen Untersuchungen übereinstimmen wird in Kap. 5.2. ausführlich diskutiert.

2.4.3. Corticoide

Auch Untersuchungen über den Gehalt endogen produzierter Corticoide wurden durchgeführt.

Rapi & Rossi konnten 1955 in Kolostralmilchextrakten von Frauen im biologischen Test eine adrenocorticale Aktivität nachweisen.

Von Ratsimamanga et al. (1961) wurde Frauen- und Kuhmilch auf den Gehalt an Nebennierenrindenhormonen untersucht, wobei sowohl biologische als auch chemisch-physikalische Verfahren zur Anwendung kamen. Dabei wurden in der Milch trächtiger Kühe höhere Corticoidkonzentrationen ($40 - 150 \mu\text{g} / 100 \text{ ml}$) als in Mischmilch (Gemisch mehrerer tausend Liter frischer Milch; $7,5 - 30 \mu\text{g} / 100 \text{ ml}$) gemessen. Besonders hohe Konzentrationen von $200 - 300 \mu\text{g} / 100 \text{ ml}$ wurden im Kolostrum gefunden.

Bei Untersuchungen über die Verstoffwechselung von Cortisol in der Mamma sowie die Ausscheidung von Cortisol über die Milch bei Ziegen stellten Paterson & Linzell (1971) fest, daß die Eliminierung von Cortisol über die Milch als unbedeutend angesehen werden muß (im Sinne einer metabolischen Ausscheidungsrate) und die gemessenen Konzentrationen von 4,0, 3,7 und 0,7 μg Cortisol pro Liter Milch dem des Plasmas entsprachen.

3. Methodischer Teil

3.1. Auswahl des Progesteronbestimmungsverfahrens

Grundsätzlich können zur Bestimmung von Progesteron drei Prinzipien zur Anwendung kommen: Biologische, chemisch - physikalische und biochemische Methoden.

1. Die Verwendung von biologischen Testmethoden schied für das vorliegende Projekt von vornherein aus, da die Empfindlichkeit den hier gestellten Ansprüchen (Ziel: Progesteronbestimmung in wenigen ml Milch) nicht genügte. Außerdem wäre mit diesen Nachweisverfahren nur der allgemeine Nachweis auf gestagene Aktivität und nicht die spezifische Bestimmung von Progesteron möglich gewesen.

2. Auch auf den Einsatz chemisch - physikalischer Verfahren wurde von Anfang an verzichtet, obwohl hinsichtlich der Spezifität und - abhängig von der jeweiligen Methode - der Empfindlichkeit den gestellten Anforderungen eventuell Rechnung zu tragen gewesen wäre. Der hierzu notwendige Arbeitsaufwand schien jedoch besonders in Hinblick auf die Bearbeitung einer großen Probenzahl zu hoch. Auf Details soll hier nicht weiter eingegangen werden; die Progesteronbestimmung beim Rind auf chemisch - physikalischem Wege wurde von Hoffmann (1972) ausführlich abgehandelt.

3. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde deshalb von Anfang an daran gedacht, eine biochemische Methode einzusetzen, d.h. einen Radioimmunotest (RIT). Bei den biochemischen Methoden speziell zur Bestimmung von Progesteron handelt es sich allgemein um Protein - Bindungs - Methoden.

Erstmals gelang es Murphy et al. (1963) über das Prinzip der Steroid - Protein Bindung ein Verfahren für die Messung einiger Steroidhormone - dazu zählte

auch Progesteron - aufzubauen. Als Bindungsprotein verwendete sie das in Kap. 2.1.3. erwähnte "Corticosterone Binding Globuline" (CBG), das nicht nur mit Corticoiden, sondern auch mit Progesteron eine Bindung eingeht. Das dabei zugrunde liegende Reaktionsschema wurde wie folgt beschrieben:

"In einem "in vitro" System befinden sich Protein, freies Steroid und an Protein gebundenes Steroid in einem dynamischen Gleichgewicht. Wird nun diesem System ein Steroidhormon zugesetzt, zu dem das Protein ebenfalls Affinität zeigt, so muß sich ein neues Gleichgewicht einstellen. Hierbei wird ein Teil des ursprünglich an Protein gebundenen Steroids aus seiner Bindung verdrängt. Diese Verdrängung ist über einen bestimmten Größenbereich proportional der dem "in vitro" System zugesetzten Steroidmenge. Wenn nun dieser Verdrängungsvorgang erfaßt werden kann, so können Rückschlüsse auf die Menge des zugesetzten Steroids gezogen werden."

Die Erfassung dieses Verdrängungsvorganges, der im allgemeinen als Kompetitive Protein-Bindungs-Reaktion bezeichnet wird, gelang Murphy et al. (1963) durch Verwendung eines radioaktiv markierten Hormons, das durch ein nicht markiertes aus seiner Bindung an das Protein verdrängt wurde. Anschließend wurde eine Trennung von proteingebundenem und nicht gebundenem Steroid durch Gleichgewichtsdialyse erreicht. Jedoch erst ab 1968, als radioaktiv markierte Steroidhormone mit einer hohen spezifischen Aktivität erhältlich wurden, kam dieses Verfahren der Steroidhormonbestimmung zu einer breiteren Anwendung. Durch Verwendung dieser hochmarkierten Verbindungen (40 - 100 Ci/mM) konnte die Empfindlichkeit der Messung bedeutend gesteigert werden, da eine sehr kleine an das Protein gebundene Steroidmenge mit hoher Impulszahl durch eine ebenso geringe Menge nicht markierten, d.h. zu

messenden Steroids, aus seiner Bindung an das Protein meßbar verdrängt wird. Außerdem gelang es, die zeitraubenden Dialyseverfahren zur Trennung der "gebundenen" Steroide von den "freien" Steroiden durch Adsorption der "freien" Steroide an spezielle Adsorbentien wie dextranbeschichtete Holzkohle, Florisil oder Fullererde (Murphy 1967) zu ersetzen. Die Abbildung 3 stellt diesen Reaktionsablauf schematisch dar.

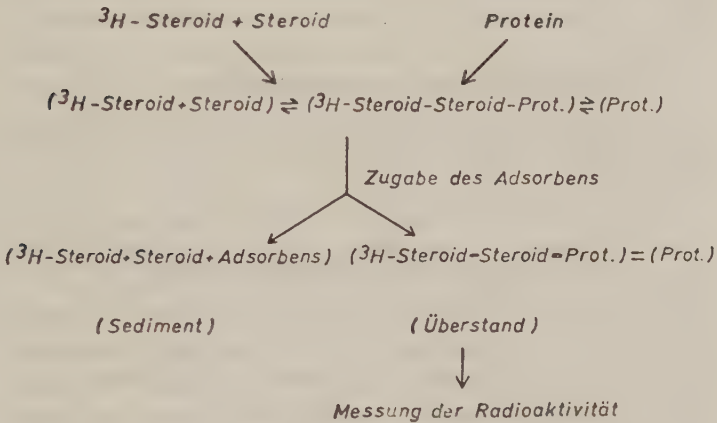


Abb.3 Schematische Darstellung der Kompetitiven Protein-Bindungs-Reaktion

Eine wesentliche Verbesserung dieser Verfahren brachte der Ersatz der mehr oder weniger spezifischen Plasmaproteine durch spezifische Zellrezeptoren und vor allem durch auf immunologischem Wege gewonnene Antikörper zur Verwendung als Bindungsproteine. In der Östrogenanalytik sind sowohl Zellrezeptoren (Koremann 1969) als auch Antikörper (Abraham 1969, Jungblut et al. 1970, Lindner et al. 1970, 1972 a, Kuss & Goebel 1972 a,b,c) eingesetzt worden. Für die Progesteronbestimmung kamen bisher neben den Plasmaproteinen nur Antikörper zur Anwendung. Allgemein

kann gesagt werden, daß heute der Verwendung von Antikörpern der Vorrang gegeben wird. Dies ist sowohl durch eine gegenüber Zellrezeptoren und Plasmaproteinen erhöhte Spezifität als auch durch eine höhere Assoziationskonstante gegenüber Plasmaproteinen bedingt (10^9 L/mol statt 10^8 L/mol; Ferin et al. 1968, Westphal 1971). Aus diesen Gründen wurde aus dem Repertoire der Protein-Bindungs-Methoden die radioimmunologische Progesteronbestimmung ausgewählt.

3.2. Angewandtes Bestimmungsverfahren

3.2.1. Prinzip der radioimmunologischen Progesteronbestimmung

Die Messung von Hormonen auf immunologischem Wege, d.h. mit einer Antigen - Antikörperreaktion, gelang erstmals Yalow & Berson (1959) bei der Bestimmung des Proteohormons Insulin im peripheren Blut des Menschen. Proteohormone, die langkettige Polypeptide sind, sind aufgrund ihres hohen Molekulargewichts als Vollantigene anzusehen, während dies bei Steroidhormonen mit einem relativ niedrigen Molekulargewicht nicht der Fall ist. Hier kam man erst nach Anwendung eines Kunstgriffes zurecht. Es zeigte sich nämlich, daß nach Koppelung eines solchen Steroids mit einem Protein (z.B. Albumin) Antikörper gewonnen werden konnten, die nicht nur gegen den Steroid - Protein - Komplex gerichtet waren, sondern auch allein mit den Steroiden eine Antigen - Antikörperreaktion eingingen. Das Steroid bewirkt also als determinierende Gruppe im Antigen die Spezifität der gebildeten Antikörper (Niswender & Midgley 1970). Bereits 1925 berichten Sachs & Kloppstock sowie 1941 King & Franks über Kopplung von Steroiden mit Proteinen. Grundlegende Untersuchungen zur Darstellung von eindeutig identifizierbaren Steroid - Protein - Konjugaten

führten jedoch erstmals Erlanger et al. (1957,1959), Beiser et al. (1959) und Liebermann et al. (1959) an der Columbia Universität in New York durch.Parallel und unabhängig davon arbeiteten Goodfriend & Schon (1958, 1960, 1961a, 1961b) sowie Goodfriend et al. (1961) an der McGill Universität in Montreal an diesem Problem.Obwohl damit bereits vor geraumer Zeit die Grundlagen für die Gewinnung von Antisera gegen Steroidhormone erarbeitet waren und damit die Einrichtung radioimmunologischer Verfahren zur Bestimmung von Steroidhormonen möglich gewesen wäre, berichtet erst 1969 Abraham über eine radioimmunologische Steroidhormonbestimmung.Mit Hilfe eines von Ferin et al. (1968) gewonnenen Antiserums gegen 17 β -Östradiol-succinyl-Rinder-Serum-Albumin gelang Abraham die Messung von Östrogenen im peripheren Blut der Frau.

Für die radioimmunologische Steroidbestimmung gilt allgemein,daß die Eigenschaften der nach einer Immunisierung gewonnenen Antikörper bzw. Antisera von ausschlaggebender Bedeutung sind.Insbesondere müssen die Spezifität und die Assoziationskonstanten der Antisera beachtet werden.DieSpezifität der Antikörper wird im wesentlichen von der Position und Art der Kopplung zwischen Steroid und Protein im verwendeten Antigen bestimmt (Niswender & Midgley 1970, Kuss & Goebel 1972 a,b, Lindner et al. 1972 a,b). Die Assoziationskonstante,durch die die Empfindlichkeit des Radioimmunotests bestimmt wird,hängt in erster Linie von den antikörperbildenden Eigenschaften des immunisierten Tieres ab;ebenso wird vermutet, daß auch das Verhältnis "Steroid : Trägermolekül" für die Bindungsaffinität ausschlaggebend ist (Jungblut 1971).Obwohl sich grundsätzlich der Einsatz von Antisera für Meßzwecke nicht von dem von Plasmaproteinen unterscheidet,erscheint es doch aufgrund der hohen Assoziationskonstanten der Immun-

körper angebracht zu sein, bei der Durchführung der Protein-Bindungs-Reaktion ein anderes Reaktionsschema zu wählen. Im hiesigen Institut hat sich das Schema der sog. "Isotopenverdünnung" bewährt. Dieses Schema, das in Abbildung 4 dargestellt ist, kann wie folgt beschrieben werden:

Wird eine gleichbleibende Menge ^3H -markierten Steroids bereits vor der Antikörperzugabe mit verschiedenen Mengen des gleichen, nicht markierten Hormons verdünnt, so wird - abhängig von den Mengen des nicht markierten Steroids - mehr bzw. weniger an markiertem Steroid an den Antikörper nach dessen Zugabe gebunden werden. Die Bindung von ^3H -markiertem Steroid ist dabei über einen bestimmten Bereich umgekehrt proportional der Menge des zugegebenen, nicht markierten Hormons; nach Erstellung einer Eichkurve können also unbekannte Mengen erfaßt werden.

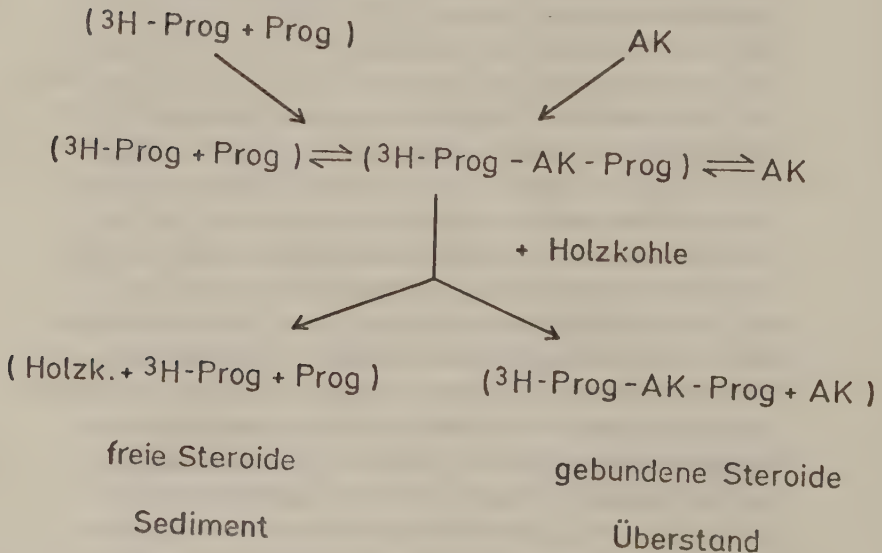


Abb. 4 Prinzip des radioimmunologischen Tests

3.2.2. Extraktionsverfahren zur Progesteronbestimmung

3.2.2.1. Extraktion von Progesteron aus Plasma

Im Gegensatz zur radioimmunologischen Bestimmung von Proteohormonen bedarf es bei der Bestimmung von Steroidhormonen auf radioimmunologischem Wege einer vorherigen Extraktion. Die Verwendung von Petroläther zur Extraktion von Progesteron aus dem peripheren Blut der Frau durch Johannson (1969) führte dazu, dieses Extraktionsverfahren auf das Rinderplasma zu übertragen.

Murphy (1967) und Johannson (1969) haben festgestellt, daß durch Petroläther nur Progesteron, 20 α - und 20 β -OH-Progesteron sowie 17 α -OH-Progesteron und Testosteron quantitativ extrahiert werden.

Von Hoffmann (1972) durchgeführte Versuche haben gezeigt, daß bei der Extraktion von Progesteron aus Rinderplasma mit Hilfe von Petroläther die Ausbeute bei 85-90 % , für 17 α -OH-Progesteron hingegen nur bei 35 % lag.

Auf den oben angeführten Erkenntnissen aufbauend wurde von Ender (1974) ein Extraktionsverfahren für Progesteron aus Rinderplasma entwickelt, das als "Halb-automatischer Extraktionsgang" bezeichnet wurde. Dieses Verfahren zur Extraktion von Progesteron wurde auch in vorliegender Arbeit für die Vergleichsbestimmungen von Progesteron in Plasmaproben herangezogen, worüber von Hoffmann & Hamburger (1973) berichtet wurde. Im einzelnen wird diese Extraktion folgendermaßen durchgeführt:

In speziell angefertigten Probenständern aus Plastik mit Metallboden können je 40 standardisierte Glaszählküvetten für Flüssigkeitsszintillationszähler mit 22 mm Durchmesser, ca. 20 ml Inhalt und Schraubverschlüssen auf einem Schüttler der Fa. Bühler (Tübingen), der horizontale, eindimensionale Bewegungen ausführt, geschüttelt werden. Insgesamt haben auf dem Schüttler

drei Einsätze, d.h. 120 Gläser Platz. In diese Glaszählküvetten werden mit einer Eppendorf - Pipette im Doppelansatz 0,5 ml Plasma einpipettiert. Aus einem Kippautomaten werden 5 ml Petroläther hinzugefügt. Hierauf werden die Gläser 15 Minuten auf dem Schüttelapparat geschüttelt. Nach diesem Vorgang werden die Proben im Ständer verbleibend bei -18°C eingefroren. Nachdem die wässrige Phase gefroren ist (Einfrierdauer ca. 30 Minuten), wird der überstehende Petroläther in Einmalreagenzgläser (7,7 x 1,4 cm, Fa. Kremer & Kreiler) abgekippt. Für diesen Vorgang ist es von Vorteil, den Metallständer auf eine Isolierschicht (Styropor, Pappe) zu stellen, um einem vorzeitigen Auftauen des Plasmas vorzubeugen. Dieser Extraktionsschritt wird anschließend nochmals wiederholt. In der Zeit, während der die Proben das zweite mal geschüttelt werden und im Gefrierschrank stehen, werden die Reagenzgläser mit dem darin befindlichen Petroläther zum Einengen des Volumens in einen Vakuumtrockenschrank gestellt. Dieser faßt über 200 Proben und ist auf ca. 42°C aufgeheizt; das Vakuum wird über eine Wasserstrahlpumpe erzeugt. Diese zwischenzeitliche Volumeneinengung ist notwendig, da sonst die zwei Petrolätherfraktionen nicht in den ca. 8 ml fassenden Gläsern vereinigt werden können. Andererseits haben sich gerade diese kleinen Gläser für die Durchführung des anschließenden R.I.T. als handlicher als größere Gläser erwiesen. Nach vollständiger Niedertrocknung können die Proben für den Radioimmunotest verwendet werden. Ist es aus arbeitstechnischen Gründen notwendig mit der Testdurchführung bis zum nächsten Morgen zu warten, so werden die Proben mit 0,1 ml Phosphatpuffer versetzt und zusammen mit den beiden Probenreihen der Standardkurve (s. Kap. 3.2.3.2.) bis zur Weiterbearbeitung in den Kühlschrank gestellt. Bei einer noch späteren Testdurchführung wird den niedergetrockneten Extrakten 1 ml dest. Methanol zugesetzt, die Testgläser mit Parafilm verschlossen und ebenfalls im Kühlschrank aufbewahrt.

Vor der Weiterverarbeitung ist das Methanol niedertrocknen (Ender 1974).

3.2.2.2. Extraktion von Progesteron aus Milch

3.2.2.2.1. Vorversuche zur Extraktion von Progesteron aus Milch

Aufgrund des guten Erfolges bei der Plasmaextraktion wurde Petroläther auch zur Extraktion von Progesteron aus der Milch herangezogen. Zunächst sollte die Extraktionsausbeute durch Wiederfindung von radioaktiv markiertem Progesteron, das der Milch vorher zugesetzt worden war, überprüft werden.

Hierzu wurden 20 ml Milch mit einer bestimmten Menge radioaktiven ^3H -Progesterons (ca. 50 000 dpm) versetzt, kräftig durchgeschüttelt, eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen, nochmals kräftig durchgeschüttelt und dann im Kühlschrank aufbewahrt. Je 1 ml der so vorbereiteten Milch wurde in 4 konische Zentrifugengläser einpipettiert. Dazu wurden je 2 ml Petroläther gegeben. Glas 1 und 2 wurden auf einem Vortexmixer 1/2 Minute lang, Glas 3 und 4 eine Minute lang gemischt. Anschließend wurde versucht, durch abzentrifugieren mit einer Tischzentrifuge bei 5000 rpm den Petroläther von der Milch zu trennen. Hierbei zeigte sich, daß bei Glas 3 und 4 beim Schütteln eine so starke Emulsionsbildung aufgetreten war, daß auch durch das Zentrifugieren eine Trennung der beiden Phasen nicht möglich war. Auch bei Glas 1 und 2 konnte aufgrund der hartnäckigen Emulsionsbildung lediglich ca. 1/3 der zugesetzten Petroläthermenge abgehebert werden. Die Messung der darin enthaltenen Menge an ^3H -Progesteron ergab eine Gesamtwiederfindung von 3,8 %.

Diese, die Extraktion offensichtlich stark beeinträchtigende, Emulsionsbildung konnte auch bei Variation des Verfahrens hinsichtlich Schüttelgeschwindigkeit, Schütteldauer und verwendete Milch- bzw. Petroläthermenge nicht verhindert werden.

Da diese Emulsionsbildung der Eiweißfraktion der Milch, vorallem dem Casein, zugeschrieben wurde (spätere Versuche mit Rahm statt Milch haben dies bestätigt; s.S. 32), wurde versucht, die Extraktion mit einer Eiweißfällung und anschließender Abtrennung dieses störenden Anteils zu beginnen.

a) Eiweißfällung mit 0,1 n Trichloressigsäure:
Zu 2 x 1 ml der vorbereiteten Milch (s.o.) wurden 5 - 6 Tropfen 0,1 n Trichloressigsäure gegeben. Kurzes Schütteln von Hand bewirkte eine Ausfällung des Eiweißanteiles. Dieser wurde mit einer Tischzentrifuge bei 5000 rpm abzentrifugiert und der überstehende Anteil mit einer Pasteur-Pipette in ein konisches Zentrifugenglas überführt. Nach Zugabe von 2 ml Petroläther wurde die Probe 1 Minute auf einem Vortexmixer geschüttelt. Die vom vorhergehenden Versuch bekannte Emulsionsbildung blieb völlig aus. Zur Trennung beider Anteile wurde die Probe kurz abzentrifugiert, der überstehende Petroläther mit einer Pasteur-Pipette in ein Reagenzglas überführt und unter N_2 niedergetrocknet. Die Überprüfung der Wiederfindung durch Messung von 3H -Progesteron ergab, daß sie bei Anwendung dieses Extraktionsganges gleich Null war.

b) Eiweißfällung und Extraktion von Progesteron mit Hilfe von siedendem Äthylalkohol:
2 x 1 ml der vorbereiteten Milch (s.o.) wurden in je ein konisches Zentrifugenglas pipettiert. Dazu wurden ca. 9 ml siedendes dest. Äthanol gegeben. Die Probe wurde 1 Minute auf einem Vortexmixer geschüttelt und anschließend in einer Tischzentrifuge kurz bei 5000 rpm abzentrifugiert. Der überstehende Äthylalkohol wurde mit einer Pasteur-Pipette in einen 100 ml Rundkolben abpipettiert und anschließend an einem Rotationsverdampfer niedergetrocknet. Daraufhin wurde der Extrakt mit Petroläther quantitativ in ein Reagenzglas überführt und darin die Wieder-

findung gemessen. Auch bei diesem Extraktionsgang konnte radioaktives Progesteron nicht gemessen werden (Wiederfindung = 0).

Als Ursache für diese schlechte Wiederfindung mußte angenommen werden, daß das Progesteron mitsamt der Eiweißfraktion ausgefallen ist und sozusagen wie eine Maus in der Falle saß. Nachdem also die Extraktion von Progesteron nach Fällung des Proteinanteiles in der Milch völlig fehlgeschlagen war, sollte in weiteren Parallelversuchen auf folgende Fragen eine Antwort gefunden werden:

1. Inwieweit ist die bei der Extraktion mit Petroläther beobachtete Emulsionsbildung vom Proteinanteil der Milch bzw. vom verwendeten Lösungsmittel abhängig?
2. Wie verteilt sich zugesetztes radioaktives Progesteron in den Anteilen der Milch, um Progesteron eventuell in spezifischen Milchbestandteilen (Magermilch - MilCHFett) bestimmen zu können?
3. Kann ein schonender Extraktionsgang für Gesamtmilch unter Vermeidung von Emulsionsbildungen entwickelt werden?

Um auf Frage 1 eine Antwort zu finden, wurde zu je 10 ml Magermilch und 10 ml Rahm eine bestimmte Menge ^3H -Progesteron (ca. 20 000 dpm) gelöst in 0,1 ml Phosphatpuffer zugegeben. Die Proben wurden 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen und mehrmals geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung des Progesterons zu garantieren. Anschließend wurden die Proben 3 mal mit 2 ml Petroläther auf dem Vortexmixer 1 Minute lang geschüttelt und kurz bei 5000 rpm abzentrifugiert. Der überstehende Petroläther sollte jeweils in einem Reagenzglas vereinigt werden. Hierbei zeigte sich, daß bei Magermilch eine sehr starke Emulsionsbildung aufgetreten war, die es unmöglich

machte, den Petroläther abzuhebern. Bei Rahm hingegen konnten bei sehr geringer Emulsionsbildung 3 mal 2 ml Petroläther abpipettiert werden. Die Wiederfindung von zu Rahm zugesetztem ^3H -Progesteron lag nach dieser Extraktion bei 50 %. Die Vermutung, daß die Emulsionsbildung vom Proteinanteil der Milch abhängig ist, hat sich also bestätigt.

Um festzustellen, inwieweit das verwendete Lösungsmittel Petroläther an dieser Emulsionsbildung beteiligt ist, wurden weitere Extraktionsversuche mit Narkoseäther und Dichlormethan durchgeführt. Als Probenmaterial wurden Magermilch, Vollmilch und Rahm verwendet. Je 1,0 ml davon wurde mit je 2 ml des entsprechenden Lösungsmittels 1 Minute auf einem Vortexmixer bei Stufe 4 geschüttelt. Wie die Tabelle 4 zeigt, in der versucht wurde, die Stärke der Emulsionsbildung subjektiv anzugeben, ist Dichlormethan zur Extraktion noch weniger geeignet als die sich in Hinblick auf die Emulsionsbildung ungefähr gleich verhaltenden Lösungsmittel Petroläther und Narkoseäther. (Im Vergleich zu Narkoseäther hat Petroläther jedoch den Vorteil, daß er ein relativ spezifisches Extraktionsmittel für Progesteron ist - s.S. 27 und sich außerdem leichter pipettieren läßt).

Tab. 4 Emulsionsbildungen nach Extraktion von Milch und Milchprodukten mit verschiedenen Lösungsmitteln

Magermilch	Vollmilch	Rahm	
++	+	-	Petroläther
++	+	-	Narkoseäther
++	++	-	Dichlormethan

++ = sehr starke Emulsionsbildung

+ = weniger starke Emulsionsbildung

- = keine Emulsionsbildung

Um eine Antwort auf Frage 2 zu erhalten, sollte überprüft werden, wie sich radioaktives Progesteron nach Zugabe zu Milch in den beiden Fraktionen, Milchrahm und Magermilch, verteilt.

Hierzu wurde zu 10 ml Vollmilch eine bestimmte Menge ^3H -Progesteron (ca. 20 000 dpm) gegeben, 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen und in dieser Zeit mehrmals geschüttelt. Danach wurden 6 ml der so vorbereiteten Milch 15 Minuten bei 0°C und 10 000 rpm zentrifugiert (in mehreren Vorversuchen bei verschiedenen Temperaturen und Umdrehungsgeschwindigkeiten hatte sich diese Art des Zentrifugierens am besten bewährt). Mit einem Spatel wurde das als obere Schicht vorliegende Milchfett von der Magermilch abgehoben. Bei der Magermilch war es anschließend nicht möglich eine Extraktion mit Petroläther durchzuführen, da die Emulsionsbildung zu stark war. Das gesamte abgehobene Milchfett wurde in einem konischen Zentrifugenglas einmal mit 4 ml und zweimal mit 2 ml Petroläther extrahiert. Die abzentrifugierten Petrolätherüberstände wurden in einem Reagenzglas vereinigt und unter N_2 vollständig niedergetrocknet; anschließend wurden 2 ml Methanol dazugegeben, die Probe 1 Minute auf einem Vortexmixer geschüttelt und 0,1 ml zur Messung der Radioaktivität entnommen. Der daraus errechnete Progesteronanteil im Rahm lag bei ca. 50 %. Berücksichtigt man jedoch, daß bei alleiniger Extraktion von Rahm die Wiederfindung von zugesetztem radioaktivem Progesteron ebenfalls bei 50 % liegt, so kann geschlossen werden, daß das in der Milch vorhandene Progesteron fast gänzlich mit dem Milchfett assoziiert ist (spätere Untersuchungen haben dieses Ergebnis bestätigt; s. Kap 4.3.).

Um eine Antwort auf die dritte Frage zu finden, inwieweit Progesteron aus der Gesamtmilch unter Vermeidung von Emulsionen extrahiert werden kann, wurden ähnlich wie bei der Extraktion von Plasma Extraktionsversuche

an einem Schüttelautomaten durchgeführt. Wie im Kapitel 3.2.2.1. über die Plasmaextraktion ausgeführt ist, können mit dem verwendeten Schüttelapparat über einen längeren Zeitraum gleichmäßige eindimensionale Schüttelbewegungen ausgeführt werden; ein weiterer Vorteil liegt darin, daß bei den für die Extraktion herangezogenen Glaszählküvetten von 2,2 cm Durchmesser eine relativ große Grenzschicht zwischen den zu mischenden Flüssigkeiten besteht.

Es wurde wie folgt vorgegangen: Je 1 ml Milch wurde in Glaszählküvetten einpipettiert und mit radioaktivem Progesteron, wie oben beschrieben, versetzt. Nach Zugabe von 5 ml Petroläther wurden die Gläser verschlossen und 15 Minuten lang bei ca. 3 Schüttelbewegungen pro Sekunde geschüttelt. Es zeigte sich eine relativ starke Emulsionsbildung; nach Einfrieren des wässrigen Anteils bei -18°C konnte nur eine geringe Menge Petroläther (ca. 2 ml) abgekippt werden. Es wurden nun nochmals 5 ml Petroläther zugegeben und der Extraktionsgang wiederholt. Eine Emulsionsbildung war jetzt nicht mehr zu beobachten. Nach erneutem Einfrieren konnte der Petroläther fast quantitativ abgekippt werden. Nach einer zweiten Wiederholung des Extraktionsganges wurden die vereinigten Petrolätherextrakte unter N_2 vollständig niedergetrocknet und 2,0 ml dest. Methanol einpipettiert. Die Proben wurden danach eine Minute lang auf einem Vortexmischer geschüttelt, wonach 0,1 ml zur Messung der Wiederfindung entnommen wurde. Diese lag bei 73 %.

In einem anschließenden Versuch wurde überprüft, inwieweit die sich bei der ersten Extraktion beobachtete Emulsionsbildung bei Erniedrigung der Schüttelfrequenz von 3 auf 2 Hin- und Herbewegungen pro Sekunde unter sonst identischen Versuchsbedingungen vermeiden läßt. Bei diesem Versuch zeigten sich in keinem der drei Extraktionsgänge Emulsionsbildungen. Speziell in diesem Versuch lag die Wiederfindung bei 84 % des zugesetzten

radioaktiven Progesterons.

Insgesamt hatten die Vorversuche zu diesem Zeitpunkt folgendes ergeben:

1. Die bei der Extraktion mit Petroläther beobachtete Emulsionsbildung ist klar vom Proteinanteil der Milch abhängig; ein Vergleich verschiedener zur Extraktion verwendeter Lösungsmittel bestätigte die Eignung von Petroläther.
2. Aufgrund des Versuchsergebnisses, daß Progesteron in der Milch fast gänzlich an das MilCHFett assoziiert ist, wäre die Störung der Extraktion durch die Emulsionsbildung mit dem Eiweißanteil der Milch durch Progesteronbestimmung nur im Fettanteil der Milch zu umgehen.
3. Die Emulsionsbildung kann aber auch durch einen schonenden Extraktionsgang verhindert werden. Dieses Verfahren der schonenden Extraktion von Progesteron aus Gesamtmilch erschien am ehesten geeignet zu sein, für Routineuntersuchungen eingesetzt zu werden. Einmal, da die bereits im 1. Vorversuch gemessene Wiederingfindung von 84 % als sehr gut bezeichnet werden kann, und zum anderen, da das aufwendige Abzentrifugieren der Milch bei Bestimmung von Progesteron im MilCHFett wegfällt.

In einem abschließenden Vorversuch zur Extraktion sollte noch geklärt werden, inwieweit die Extraktionsausbeute durch Veränderung des Petrolätheranteiles bzw. durch eine zusätzliche Verdünnung der Milch mit Aqua bidest verbessert werden kann. (Die Spekulation, daß die Extraktionsausbeute von Progesteron durch Zugabe von Wasser erhöht werden könnte, beruhte darauf, daß durch diese Verdünnung die Bindung von Progesteron an den Fett- und Proteinanteil der Milch verringert würde.)

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Tabelle 5 zusammengefaßt:

Tab. 5 Extraktion von 1,0 ml Milch unter Zugabe von verschiedenen Mengen
Aqua bidest sowie Verwendung verschiedener Mengen Petroläther

Versuch Nr	1	2	3	4	5	6	7	8
ml Aqua bidest	0	1	2	3	0	1	2	3
ml Petroläther	3x5	3x5	3x5	3x5	1x10 2x5	1x10 2x5	1x10 2x5	1x10 2x5
% Wiederfindung	80	93	82	86	86	86	84	99
	87	81	86	75	93	99	94	82
	85	82	79	81	91	78	91	81
	89	81	84	75	81	95	83	81
	86	88	81	87	98	89	85	86
% mittlere Wiederfindung	85,4	85,0	82,4	80,8	89,8	89,4	87,4	85,8
$\bar{x}$	3,3	5,3	2,7	5,8	6,5	8,1	4,8	7,6

Zunächst kann gesagt werden, daß auch ohne Veränderung des Extraktionsverfahrens (d.h. 1 ml Milch mit 5 ml Petroläther extrahiert) bei entsprechender Einarbeitung die Wiederfindung auf durchschnittlich über 85 % gesteigert werden konnte, wie Versuch Nr. 1 zeigt. Bei Zugabe von 1 und 2 ml Wasser konnte die Wiederfindung nicht verbessert werden (Versuche 2, 3), bei 3 ml Wasser war sie wesentlich schlechter (Versuch 4).

Nach Modifikation des Extraktionsverfahrens - es wurde eine Primärextraktion mit 10 ml Petroläther durchgeführt und anschließend mit 2 x 5 ml Petroläther nachextrahiert - konnte die Wiederfindung von durchschnittlich 85 % (Versuch Nr. 1) auf ca. 90 % (Versuch Nr. 5) gehoben werden. Bei Beibehaltung dieser Petroläthermengen und Zugabe steigender Mengen Wasser ergab sich auch hier eine Verschlechterung der Wiederfindung (Versuch Nr. 6, 7, 8).

Demnach wäre das Extraktionsverfahren von Versuch Nr. 5 (1 ml Milch extrahiert mit 1 x 10 und 2 x 5 ml Petroläther) am geeignetsten. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß eine Menge von 20 ml Petroläther, wie sie bei diesem Verfahren anfällt, am Rotationsverdampfer abgedampft werden muß, während 15 ml, wie sie beim Verfahren Nr. 1 anfallen (Extraktion mit 3 x 5 ml Petroläther), noch in Standard-Zentrifugengläsern abgedampft werden können. Dadurch wird die Kapazität der Methode erheblich erweitert. Nachdem aber auch eine Wiederfindung von 85 % als sehr gut bezeichnet werden muß, wurde letzteres Verfahren beibehalten.

In späteren Untersuchungen zeigte sich, daß aufgrund hoher Progesteronkonzentrationen pro ml Milch mit der zu extrahierenden Ausgangsmenge auf 0,2 ml (in Ausnahmefällen sogar auf 0,1 ml) Milch zurückgegangen werden mußte. Deshalb wurde eine zweimalige Extraktion dieser geringen Milchmenge mit 5 ml Petroläther als

ausreichend erachtet. Eine Überprüfung der Wiederfindung erbrachte einen Wert von 92,3 % mit einer Standardabweichung von $\pm 5,72$ ($V_k = 6,2 \%$, $n = 15$).

3.2.2.2.2. Vorversuche zur weiteren Reinigung des Erstextraktes aus Milch

Nach der Extraktion von Progesteron aus der Milch mit Hilfe von Petroläther zeigte sich im niedergetrockneten Extrakt ein starker Rückstand, der hauptsächlich aus dem Fettanteil der Milch zu bestehen schien und die Protein-Bindungs-Reaktion, d.h. den Radioimmuntest störte. Aufgabe der folgenden Versuche war es, einen Arbeitsgang zur Abtrennung dieses Rückstandes zu entwickeln, um eine einwandfreie Messung von Progesteron mit dem Radioimmuntest zu garantieren.

Auch andere Autoren, die über Bestimmung von Steroidhormonen in Milch berichten, haben solche Extrakt-rückstände als störend bezeichnet (Monval-Gerondeau et al. 1970, Laing & Heap 1971, Darling & Harkness 1973).

So führten zur Abtrennung von Lipiden nach der Progesteronextraktion aus Kuhmilch mit Hilfe von Petroläther Laing & Heap (1971) ein 48-stündiges Ausfrieren der Probe in 1 ml 70 %-igem wässrigem Methanol bei -15°C ein. (Zur Progesteronmessung verwendeten sie die Kompetitive Protein-Bindungs-Reaktion nach Basset et al. (1969)).

Darling & Harkness (1973) haben Steroidhormone in der Kuhmilch - nach dünnschichtchromatographischer Vorreinigung - durch Messung am Gaschromatographen bestimmt. Weitere vor der Endmessung durchgeführte Reinigungsschritte waren eine Verseifung der Probe und Extraktion der Steroide mit Diäthyläther, eine Oxydation mit CrO_3 und schließlich eine Trennung mit Girard's Reagenz.

Auch Monval-Gerondeau et al. (1970) haben bei der Bestimmung von Östrogenen in der Kuhmilch festgestellt, daß ein beträchtlicher Anteil der Östrogenmenge an die Fettfraktion der Milch gebunden ist. Die Extraktion wurde mit Äther durchgeführt; die Reinigung von Fettanteilen geschah ebenfalls durch Ausfrieren, jedoch in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus 2 ml Äther und 8 ml 70 %-iger wässriger Methanollösung für zwei Stunden bei -25°C .

Um das Verfahren möglichst einfach zu halten, war daran gedacht, in den eigenen Untersuchungen die fettigen Rückstände entweder durch eine Lösungsverteilung zwischen 80 %-igem Methanol und Petroläther oder durch Ausfrieren der Probe in 80 %-igem Methanol abzusondern.

Um die Technik des Ausfrierens zu überprüfen, wurden in einer ersten Versuchsreihe insgesamt 8 Proben frischer Vollmilch wie oben beschrieben mit Petroläther extrahiert und das Lösungsmittel evaporiert. Zu jeweils zwei Proben wurden 2 ml 90 %-iges, 2 ml 80 %-iges und 2 ml 70 %-iges Methanol zugegeben. Die zwei verbleibenden Proben wurden zur Kontrolle in dest. Methanol aufgenommen. Nach gründlichem Mischen am Vortexmixer zeigte sich, daß sich in keinem Fall der Rückstand vollständig löste, sondern feinst verteilt vorhanden war und sich dann sofort in einem immer größer werdenden Tropfen am Boden der Gläser sammelte. Anschließend wurden die Proben über Nacht in einen Gefrierschrank von -18°C gestellt. Hierbei zeigte sich ein Phänomen, das für das Reinigungsverfahren von entscheidender Bedeutung war: Während bei allen wässrigen Methanollösungen eine etwa gleiche Menge von Milchfett sich in Form eines noch etwas größer gewordenen Tropfens am Boden des Glases gesammelt hatte und das überstehende Methanol klar

blieb, bildeten sich im dest. Methanol neben dem Fetttropfen weiße, kristallartige Flocken. Dieser flockige Rückstand wurde nicht näher untersucht, es ist aber mit ziemlicher Sicherheit anzunehmen, daß es sich um weitere Lipidanteile aus der Milch handelt. Bei Zimmertemperatur löste sich der Rückstand allmählich wieder im Methanol auf. Ein Abzentrifugieren dieses Niederschlages in einer Tischzentrifuge im Kältelabor war gut möglich. Der Bodensatz festigte sich allerdings nur gering, sodaß die Proben vorsichtig aus der Zentrifuge genommen und der Überstand sofort mit Pasteur-Pipetten abgehebert werden mußte.

Nachdem sich in dieser Versuchsreihe der größte Reinigungserfolg nach Aufnahme der Probe in dest. Methanol^x und Einfrieren bei -18°C gezeigt hatte, wurde die Effektivität dieses Reinigungsschrittes zu der einer Lösungsmittelverteilung zwischen 80 %-igem Methanol und Petroläther überprüft.

Die Lösungsmittelverteilung wurde wie folgt durchgeführt: Dem niedergetrockneten Extrakt wurden 2 ml 80 %-iges Methanol und 2 ml Petroläther zugegeben. Nach guter Durchmischung am Vortexmixer wurden die Proben kurz abzentrifugiert und der überstehende Petroläther abgehebert; dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

In einem Parallelversuch wurden die beiden Reinigungsschritte verglichen, indem in den während eines Zyklus der Kuh "Rowido" aus dem Nachgemelk entnommenen Milchproben Progesteron mit dem Radioimmunotest bestimmt werden sollte. Wie das Ergebnis in Tabelle 6 zeigt, wurde in allen Proben ein Wert um 0,5 ng Progesteron pro ml Milch gemessen; Unterschiede in den beiden Reinigungsverfahren zeigten sich demnach nicht.

x) enthält noch ca. 3 % Wasser!

Tab. 6 Progesteronmehrwerte (ng / ml) im Nachgemelk der Kuh "Rowido" während eines Zyklus nach Anwendung verschiedener Verfahren zur Reinigung des Erstextraktes

Zyklustag	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	0
Ausfrieren in dest. Methanol	0,40	0,55	0,60	0,35	0,40	0,50	0,55	0,50	0,40	0,45	0,55
Lösungsmittel- verteilung	0,50	0,45	0,40	0,40	0,50	0,55	0,60	0,50	0,55	0,45	0,40
Ausfrieren + Lösungs- mittel- verteilung	0,50	1,13	7,50	17,0	26,0	23,0	31,3	23,0	18,5	0,75	0,50

Nach diesem Ergebnis wäre einmal anzunehmen gewesen, daß Progesteron nicht in Abhängigkeit vom Zyklusstand über die Milch ausgeschieden wird, oder, daß durch noch vorhandene Verunreinigungen, die Protein-Bindungs-Reaktion gestört wurde. Um die letztere Möglichkeit ausschließen zu können, wurden in einem weiteren Verfahren die beiden Reinigungsschritte hintereinandergeschaltet; d.h., daß nach der primären Petrol-ätherextraktion die Proben zunächst dem Gefrierschritt und dann der Lösungsmittelverteilung unterworfen wurden.

Nach diesem Verfahren wurden nun nochmals die Proben der Kuh "Rowido" (s.o.) auf ihren Progesterongehalt untersucht. Wie die in Tabelle 6 wiedergegebenen Meßwerte zeigen, konnten mit der Anbildung des Gelbkörpers steigende Werte von Progesteron in der Milch gemessen werden. Erstmals konnte also in eigenen Untersuchungen eine Abhängigkeit der Progesteronausscheidung über die Milch vom Zyklusstadium der Kuh nachgewiesen werden.

In weiteren Vorversuchen, die im Detail nicht erwähnt werden sollen, ergaben sich nachfolgende wichtige Hinweise für die Extraktion:

So war es einmal wichtig, daß nach dem Ausfrierschritt der Lipidrückstand in einer vorgekühlten Zentrifuge im Kühlraum abzentrifugiert wurde; nur so konnte ein erneutes in Lösung gehen des Rückstandes und eine Störung der Protein-Bindungs-Reaktion vermieden werden.

Weiterhin wurde festgestellt, daß die Reihenfolge der beiden Reinigungsschritte gleichgültig ist. Es erwies sich jedoch als sehr praktikabel, zunächst den Gefrierschritt durchzuführen und dann den gewonnenen methanolischen Extrakt (ca. 2 ml) durch Zugabe von 0,5 ml Aqua bidest auf eine ca. 80 %-ige wässrige Methanollösung einzustellen. Diese wurde dann zweimal

gegen 2 ml Petroläther ausgeschüttelt.

Nach dieser Reihe von Vorversuchen konnte ein "endgültiges Extraktionsverfahren" aufgestellt werden (s.nächstes Kapitel).

3.2.2.2.3. Endgültiger Extraktions- und Reinigungsgang mit Bestimmung der Extraktionsausbeute

Soweit nicht Frischmilch untersucht wird, werden die Proben bei -18°C bis zur Aufarbeitung aufbewahrt. Nach dem Auftauen werden diese Proben, sowie auch die Frischmilchproben vor der eigentlichen Extraktion im Wasserbad bei 38°C erwärmt und gut geschüttelt. Aus jeder Probe werden dann mit einer Eppendorf-Pipette 0,2 ml im Doppelansatz entnommen und in standardisierte Glaszählküvetten (s.Kap.3.2.2.1.) überführt. Bei Proben, deren Progesteronkonzentration die Ablesbarkeit in der Standardkurve übersteigt, ist eine Wiederholung der Untersuchung mit einer Menge von 0,1 ml Milch durchzuführen.

Nach Zugabe von 5 ml Petroläther aus einem Kippautomaten werden die Probengläser verschlossen, auf einem Schüttelapparat (s.Kap.3.2.2.1.) bei 2 Arbeitsbewegungen pro Sekunde (s.Kap 3.2.2.2.1.) 15 Minuten lang geschüttelt und danach ca. 30 Minuten lang bei -18°C aufbewahrt. Nach dem Einfrieren der wässrigen Phase am Boden des Glases kann der überstehende Petroläther, in dem sich das extrahierte Progesteron und der größte Teil des MilCHFettes sowie weitere Lipidbestandteile befinden, in konische Zentrifugengläser (15 ml Inhalt) abgekippt werden. Bei einer größeren Probenzahl geschieht dies im Kühlraum bei ca. 4°C , da bei Zimmertemperatur die Milch relativ schnell auftaut. Dieser Extraktionsschritt wird auf dieselbe Art und Weise nochmals wiederholt.

Die in konischen Zentrifugengläsern vereinigten Petrolätherextrakte werden zum Abdampfen des Petroläthers in einen Vakuumtrockenschrank, der auf eine Temperatur von ca. 42°C eingestellt ist, verbracht. Bei kleinerer Probenzahl empfiehlt es sich aus Gründen der Zeitersparnis, den Petroläther im N₂-Strom abzdampfen.

Auf den nun trockenen Extrakt werden aus einem Kippautomaten 2 ml dest. Methanol gegeben. Durch ein intensives Schütteln der Proben - eine Minute lang auf einem Vortexmixer - kommt es zu einer feinsten Verteilung des mitextrahierten Fettes im Methanol, wobei das Progesteron im Methanol in Lösung geht, ein Großteil des Fettes sich aber anschließend wieder in Form eines Tropfens am Boden des Glases niederschlägt (s. Kap. 3.2.2.2.1.). Bei diesem Schritt ist darauf zu achten, daß die Proben entweder vom Vakuumtrockenschrank her noch warm sind oder sonst irgendwo angewärmt werden, um die feine Fettverteilung zu garantieren.

Hierauf werden die Proben bei -18°C über Nacht eingefroren. Durch diesen Vorgang fallen sowohl weiteres Milchfett als auch Lipidbestandteile in Form weißer Flocken aus. Nach Abzentrifugation in einer vorgekühlten Tischzentrifuge im Kühlraum bei 5000 rpm für ca. eine Minute wird das überstehende Methanol mit Pasteur-Pipetten in Einwegreagenzgläser (100 x 15 mm) abgehebert. Das Abzentrifugieren kann auch in einer Kühlzentrifuge, die auf 0°C eingestellt ist, vorgenommen werden. Durch Zugabe von 0,5 ml Aqua bidest mit einer automatischen Selbstfüllerspritze entstehen ca. 2,5 ml einer etwa 80 %-igen wässrigen Methanollösung, die noch leicht weißlich getrübt ist.

Zur vollständigen Reinigung werden 2 ml Petroläther aus einem Kippautomaten zugegeben und die Proben eine Minute lang auf einem Vortexmixer geschüttelt. Da sich die beiden Phasen nur sehr langsam voneinander trennen,

wird kurz abzentrifugiert. Der überstehende Petroläther wird mit Pasteur-Pipetten abgehebert und verworfen. Diese Lösungsmittelverteilung wird nochmals wiederholt. Die verbleibenden 2,5 ml 80 %-iger wässriger Methanollösung in den einzelnen Proben, die das zu bestimmende Progesteron enthalten, werden über Nacht im Vakuumtrockenschrank zur Trockne gebracht. Dieses Verfahren der Probeneinengung im Vakuumtrockenschrank erwies sich als sehr viel kostensparender als die vielleicht etwas schneller durchzuführende Niedertrocknung unter N_2 .

Ergänzend sei erwähnt, daß statt 0,2 ml Milch auch 10 mg MilCHFett unter Beibehaltung desselben Extraktionsganges auf Progesteron untersucht werden konnten (s. Kap. 4.3.3.).

Nach Festlegung des endgültigen Extraktionsganges zur Progesteronbestimmung in der Milch wurde nochmals in einem weiteren Kontrollversuch die Extraktionsausbeute nach Durchführung des gesamten Arbeitsganges überprüft.

Zu diesem Zweck wurden in 18 Glaszählküvetten jeweils ca. 3600 dpm 3H -Progesteron, gelöst in 0,1 ml dest. Methanol, einpipettiert. Nach Niedertrocknung des Methanols unter N_2 wurden je 0,2 ml Milch^x zugegeben. Die Proben wurden 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen, wobei sie mehrmals geschüttelt wurden, um eine homogene Verteilung des 3H -Progesterons zu gewährleisten.

Danach wurde der vollständige Extraktions- und Reinigungsgang durchgeführt. Statt Durchführung des Radioimmuntests wurden jeder Probe 1,0 ml Methanol zugegeben und die Proben 1 Minute lang auf einem Vortexmixer geschüttelt. Danach wurden 0,1 ml zur Messung der Radioaktivität entnommen. Die daraus errechnete Wiederfindung des zugesetzten 3H -Progesterons lag bei durchschnittlich 83,7 % mit einer Standardabweichung von $\pm 4,29$ % und

x) Nachgemelk; der endogene Progesterongehalt lag bei 0,2 ng / ml Milch.

einem Variationskoeffizienten von 5,13 %. Aufgrund dieser festgestellten konstanten Wiederfindung erschien es nicht notwendig, bei weiteren Untersuchungen mit einer internen Standardisierung zur Berechnung der Aufarbeitungsverluste in Einzelproben zu arbeiten. (Wiederfindungsversuche mit Progesteronzusätzen verschiedener Konzentration, s. Kap. 3.2.4., haben das obige Ergebnis bestätigt.)

3.2.3. Durchführung des Radioimmuntests zur Bestimmung von Progesteron in Plasma und Milch

3.2.3.1. Charakterisierung der verwendeten Antisera

Die für die eigenen Untersuchungen zur Verfügung stehenden Antisera wurden am hiesigen Institut nach Immunisierung von Kaninchen mit 11a-OH-Progesteron-Hemisuccinat-Rinderserumalbumin (11a-OH-Prog-HS-RSA) gewonnen (siehe bei Hoffmann 1972 und Hoffmann et al. 1973). Die auf diese Weise gewonnenen Antisera lassen eine hohe Spezifität erwarten, da die funktionellen Gruppen im Progesteronmolekül durch die Art der Koppelung mit dem Albumin nicht blockiert werden (s. Abb. 5).

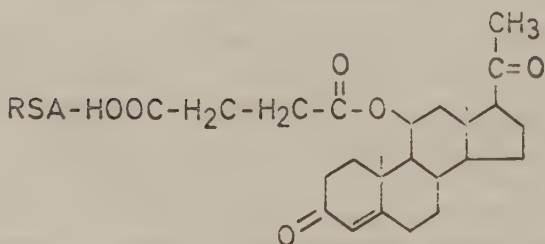


Abb. 5 11a-OH-Progesteron-HS-RSA

3.2.3.1.1. Bestimmung der Bindungskapazität

Die Bestimmung der Bindungskapazität erlaubt eine Aussage darüber, inwieweit ^3H -Progesteron durch verschiedene Antiserumkonzentrationen gebunden wird. Bei diesem Test ist die Menge des angebotenen radioaktiven Progesterons konstant, variabel ist die Konzentration der Antiserumverdünnung. Für die weiteren Untersuchungen wurde die Menge des vorgelegten radioaktiven Progesterons, von nun an als "Vorlage" bezeichnet, auf ca. 20 000 dpm festgelegt. Dies entspricht einer Menge von ca. 30 pg Progesteron. Die "Vorlage" war einheitlich in 0,1 ml Phosphatpuffer gelöst.

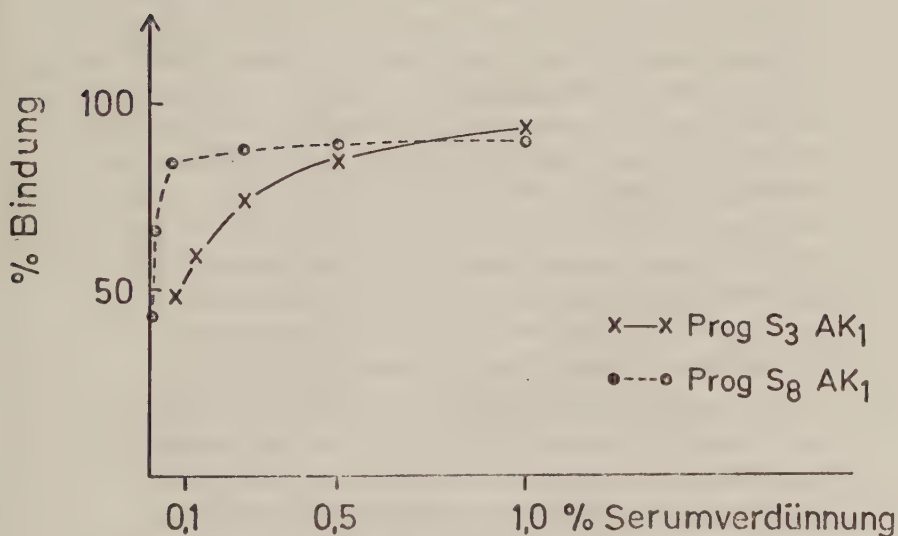


Abb. 6 Bestimmung der Bindungskapazität der Progesteronantisera "Prog S 3 AK 1" und "Prog S 8 AK 1"

Die Serumverdünnungen wurden von 1 % bis 0,007 % in RSA-Puffer angesetzt. Die Protein-Bindungs-Reaktion wurde wie in Kap. 3.2.3.2. beschrieben durchgeführt. Allgemein hat sich für Meßzwecke eine Antiserumverdünnung am günstigsten erwiesen, durch die das vorgelegte ^3H -Progesteron noch zu 50 % gebunden wird (Hoffmann 1972).

Das Ergebnis der Untersuchungen der beiden verwendeten Antisera "Prog S 3 AK 1" und "Prog S 8 AK 1" zeigt die Abbildung 6. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, lagen die gewählten Antiserumverdünnungen bei 0,1 % (Prog S 3 AK 1) und 0,01 % (Prog S 8 AK 1).

3.2.3.1.2. Überprüfung auf Kreuzreaktionen

Diese Überprüfung zeigt, ob das gewonnene Antiserum außer mit Progesteron auch noch mit anderen Steroidhormonen eine Bindung eingeht und wie stark diese ist. Als einheitliche Ausgangsbasis wurde die Bindung der Progesteron-Vorlage gleich 100 % gesetzt (rel. Bindung). Die Abbildungen 7 und 8 zeigen das Ergebnis der Überprüfung der beiden verwendeten Antisera Prog S 3 AK 1 und Prog S 8 AK 1. Getestet wurden die Verbindungen Progesteron, 17 α -OH-Progesteron, Pregnenolon, 20 β -OH-Progesteron, Pregnan-3 α ,17 α -diol, Cortisol, Corticosteron, Desoxycorticosteron, Testosteron, Dehydroepiandrosteron und Östradiol-17 β .

Geringgradige Kreuzreaktionen, die aber nicht weiter ins Gewicht fallen, sind lediglich mit den beiden C₂₁-Steroiden Desoxycorticosteron und Corticosteron zu verzeichnen. Eine eventuelle Beeinflussung des Radioimmuntests wird aber auch dadurch ausgeschlossen, daß diese beiden Verbindungen durch das verwendete Extraktionsmittel Petroläther nur in geringstem Maße mitextrahiert werden (s. Kap. 3.2.2.).

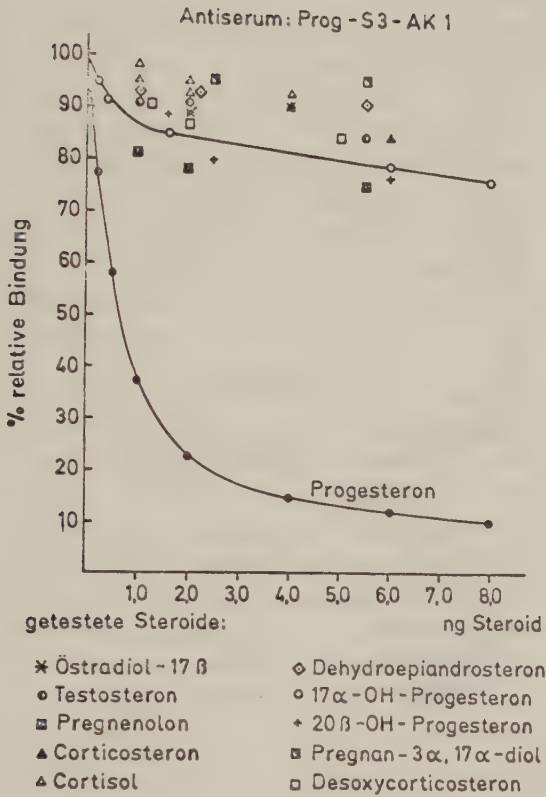


Abb. 7 Überprüfung auf Kreuzreaktionen des Progesteron-Antiserums "Prog S 3 AK 1" mit verschiedenen Steroidhormonen

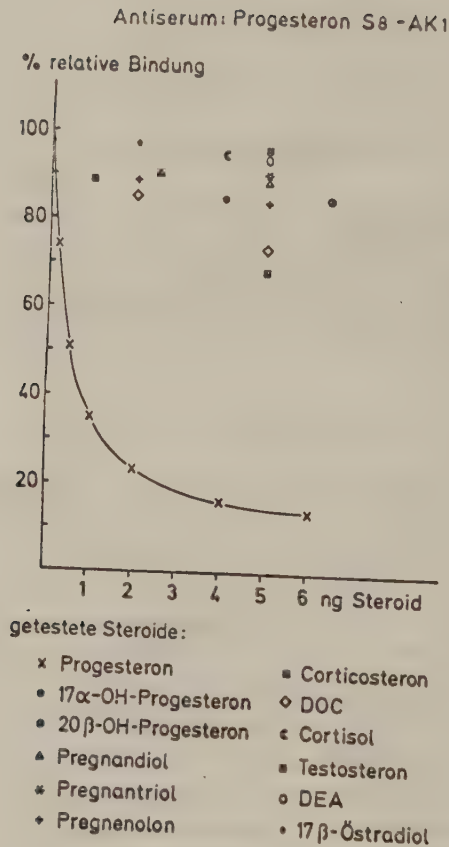


Abb. 8 Überprüfung auf Kreuzreaktionen des Progesteron-Antiserums "Prog S 8 AK 1" mit verschiedenen Steroidhormonen

3.2.3.2. Durchführung und Auswertung der Protein-Bindungs-Reaktion

Für die Durchführung der Protein-Bindungs-Reaktion werden zu den in den Einweg-Testgläsern niedergetrockneten Extrakten je 0,1 ml Phosphatpuffer zugegeben. Dementsprechend sind die für die Erstellung einer Standardkurve notwendigen Progesteronmengen bereits in 0,1 ml Phosphatpuffer gelöst. Zu allen Proben (biologische Proben und Standardkurve) werden dann mit einer Eppendorf-Pipette 0,1 ml "Vorlage" gegeben (für eine größere Probenzahl eignet sich eine 0,1 ml Hamilton-Dosierspritze mit einem Füllvolumen von 5 ml sehr gut). Anschließend werden 0,5 ml Antiserumverdünnung mit einer Revolverspritze zugegeben.

Die Proben werden dann gemeinsam im Reagenzglasständer kurz geschüttelt und in ein Wasserbad von 37°C gestellt. Nach 7,5 Minuten werden die Proben einzeln an einem Vortexmischer durchgeschüttelt und nach weiteren 7,5 Minuten im Wasserbad für 1 Stunde in ein Eisbad (4°C) gestellt. Danach werden, zur Trennung des freien von dem an die Antikörper gebundenen Progesterons, 0,5 ml einer im Eisbad (4°C) gekühlten und gut gerührten Holzkohlesuspension mit einer automatischen Selbstfüllerspritze zugegeben. Die Proben werden dann 1 Minute lang "en bloc" im Gestell gut geschüttelt, nochmals für 5 Minuten im Eisbad belassen und anschließend 15 Minuten lang in einer Kühlzentrifuge bei ca. 2000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Kohle bildet einen Bodensatz, der bei den Plasmaproben gut abgesetzt und gefestigt ist; der Überstand, in dem sich das an die Antikörper gebundene radioaktive und nicht markierte Progesteron befindet, wird zur Bestimmung der Radioaktivität in eine Zählküvette abgekippt, in die vorher 10 ml Szintillationsflüssigkeit mit einem Kippautomaten gegeben wurden.

Bei Untersuchung von Milchproben festigt sich der Kohle-Bodensatz weniger gut, deshalb werden vom Überstand mit einer Eppendorf-Pipette je 1,0 ml in entsprechend vorbereitete Zählküvetten abpipettiert.

Die Probenzahl eines Tests ist durch die Kapazität der Kühlzentrifuge auf 48 Gläser begrenzt; die ersten und die letzten 7 Proben eines Tests bilden jeweils eine Eichkurve (0 bis 6,0 ng Progesteron).

Der Sinn der Inkubation im Wasserbad bei 37°C liegt bei dem hier gewählten Versuchsansatz vornehmlich darin, das in den Testgläsern niedergetrocknete Progesteron vollständig zur Lösung zu bringen.

Die für den Versuchsablauf angegebenen Inkubationszeiten haben sich als gut handhabbar bewährt; geringe zeitliche Verschiebungen zeigen keinen negativen Einfluß auf das Ergebnis. Es sollten jedoch Mindestinkubationszeiten von 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C und von 45 Minuten im Eisbad eingehalten werden.

Für die Auswertung des radioimmunologischen Tests standen zwei Flüssigkeitsszintillationszähler zur Messung der Radioaktivität zur Verfügung. Bei beiden Geräten war ein Kanal auf eine optimale Tritium-Zählausbeute eingestellt, die konstant bei 40 % bzw. 56 % lag. Da ein Test oder auch eine Testserie immer am gleichen Gerät gezählt wurde, konnte auf eine Umrechnung auf die tatsächlich vorhandene Zerfallsrate "dpm" (disintegrations per minute) durch Berücksichtigung des Faktors "Zählausbeute" verzichtet werden. Alle Berechnungen wurden daher mit den tatsächlich gemessenen Impulsen pro Minute "cpm" (counts per minute) durchgeführt. Die cpm-Zahl wurde aus einer zweimal fünfminütigen Zählzeit

errechnet.

Bei der graphischen Darstellung der Standardkurven wurden auf der Abszisse ng Progesteron und auf der Ordinate die gemessenen cpm aufgetragen. Aus den zwei Standardkurven, die in jedem Test angestellt worden waren, wurden die Mittelwerte jedes Eichpunktes errechnet (die Spannweite der Doppelbestimmungen diente als Kontrolle der Genauigkeit des Tests).

Eine solche Standardkurve ist in Abbildung 9 dargestellt. Über die in den biologischen Proben ermittelten cpm-Zahlen kann die Progesteronmenge direkt in ng an der Standardkurve abgelesen werden. Dieser Wert muß dann, entsprechend den extrahierten Plasma- bzw. Milchvolumina, auf 1 ml korrigiert werden.

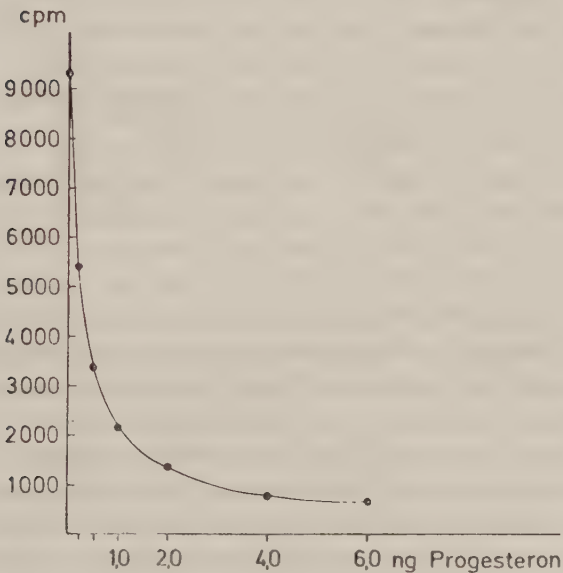


Abb. 9 Progesteron-Standardkurve

3.2.4. Überprüfung der Zuverlässigkeitskriterien

Die Spezifität der Methode ist im wesentlichen durch die verwendeten Antisera bestimmt (s.Kap.3.2.3.1.). In früheren Untersuchungen konnten Hoffmann et al. (1973) durch Vergleichsmessungen mit der Kompetitiven Protein-Bindungs-Reaktion sowie gaschromatographischen Messungen zeigen, daß sich die radioimmunologische Progesteronbestimmung im Rinderblut durch eine hohe Spezifität auszeichnet. Diese Aussage kann auch auf die vorliegenden Untersuchungen übertragen werden. Die hohe Spezifität der radioimmunologischen Progesteronbestimmung auch in der Milch konnte in einem speziellen Versuch nachgewiesen werden.

Hier wurde bei der Kuh "Kaliro" am 12. Zyklustag das Corpus luteum periodicum durch einen rektalen Eingriff vom Ovar nach dem Abendmelken entfernt. Progesteron wurde vom 1. Zyklustag an bis zur Eukleation und dann bis zur nachfolgenden Brunst in Milch und Plasma bestimmt. Das Ergebnis zeigt Tabelle 35 (s.Anhang) und ist zur Verdeutlichung in Abbildung 10 graphisch dargestellt.

Deutlich zeigt sich bei der Progesteronbestimmung in Plasma und Milch die Anbildung des Corpus luteum bis zum 12. Zyklustag, an dem im Plasma eine Progesteronkonzentration von 5,0 ng / ml und in der Milch eine solche von 10,5 ng / ml gemessen wurde. Übereinstimmend werden am nächsten Morgen nach der Eukleation in Plasma und Milch drastisch abgefallene Progesteronkonzentrationen gemessen (Progesteronabfall im Plasma ca.95 %, in der Milch ca.93 %). Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß durch die angewandte Methodik in der Milch hochspezifisch vom Corpus luteum stammendes Progesteron erfaßt wird.

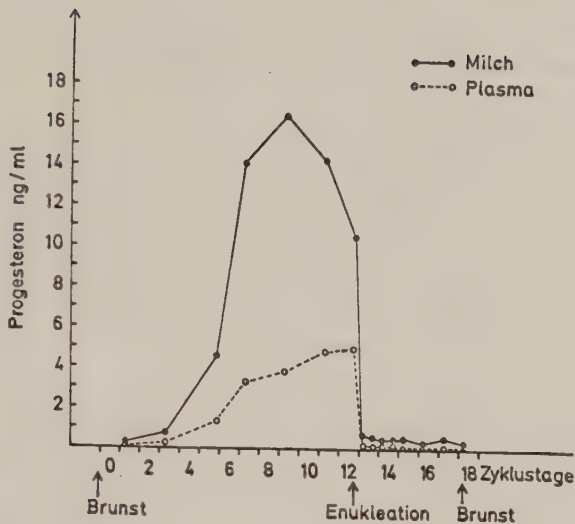


Abb. 10 Progesteron-Konzentration in peripherem Blutplasma und Gesamtmilch vor und nach der Entfernung des Corpus luteum durch Eukluation bei der Kuh "Kaliro"

Die Empfindlichkeit einer Methode ist definiert als die kleinste Menge, die sich noch von Null unterscheiden läßt. Dieser Wert lag, wie aus der Standardkurve zu erkennen ist, bei ca. 0,02 ng. Da sich aus der Überprüfung des Reagentienleerwertes bei 40 Bestimmungen ein Mittelwert von 0,032 ng ergab, wurde jedoch für die angewandte Methode die untere Grenze der Meßgenauigkeit auf das doppelte des Reagentienleerwertes, d.h. ca. 0,06 ng festgelegt.

Die Genauigkeit der Methode wurde überprüft durch Wiederfindungsversuche von nicht markiertem Progesteron, das in einer Menge von 0,2 bis 6,0 ng jeweils 0,2 ml Milch zugesetzt worden war. Die endogene Progesteronkonzentration lag hier bei 0,2 ng pro ml Milch.

Wie Tabelle 7 zeigt, ergeben die Direktwerte eine aufsteigende Wiederfindung von 0,17 ng (bei einem Zusatz von 0,2 ng) bis 4,91 ng (bei einem Zusatz von 6,0 ng). Nach Korrektur dieser Direktwerte mit dem durchschnittlichen Wiederfindungsfaktor 83,7 % (s. Kap. 3.2.2.2.3.) liegt die Wiederfindung in jedem Falle bei annähernd 100 %.

Diese sehr gute Genauigkeit der Methode konnte auch in einem weiteren Experiment bestätigt werden. So führte, wie Tabelle 8 zeigt, auch die Extraktion von unterschiedlichen Volumina der gleichen Milch (50 - 200 μ l) zu einem annähernd gleichen Ergebnis bei Bezugnahme auf ng Progesteron pro ml Milch. Im Durchschnitt ergab sich hier ein Mittelwert von 21,91 ng Progesteron pro ml Milch mit einer Standardabweichung von $s = 1,58$ ng und einem Variationskoeffizienten von 7,0 %.

Die Reproduzierbarkeit der Methode ergab sich aus wiederholten Messungen von Progesteron in zwei Milchpools zu verschiedenen Zeitpunkten, wobei ein Milchpool eine relativ hohe und der zweite eine relativ niedrige Progesteronkonzentration aufwies.

So wurde Progesteron in einer aus dem Nachgemelk stammenden Milchprobe der Kuh "Kalidip" im Zeitraum vom 12.3.73 bis 4.8.73 in Doppelproben bestimmt. Aus 25 Bestimmungen ergab sich ein Mittelwert von 23,6 ng Progesteron pro ml Milch mit einer Standardabweichung von $\pm 2,06$ ng und einem sehr

Tab. 7 Wiederfindung abgestufter Mengen Progesterons nach Zugabe zu
0,2 ml Milch

Zugesetzte Menge Progesteron (ng)	0,2	0,5	1,0	2,0	4,0	6,0
Direktwerte						
Mittelwerte (n = 3)	0,17	0,40	0,83	1,55	3,18	4,91
Wieder- findung:						
Korrekturwerte bezogen auf den durchschnitt- lichen Wieder- findungsfaktor von 83,7 %	0,20	0,48	0,99	1,85	3,79	5,86
Gesamtwieder- findung in %	100	96	99	93	95	98

Tab. 8 Progesteronbestimmung in unterschiedlichen Volumina der gleichen Milch (Bezugnahme auf ng Progesteron / ml Milch)

extrahiertes Volumen (ul)	50	100	150	200
n	5	5	5	4
x (in ng / ml)	21,16	23,10	22,60	20,50
s	1,80	0,74	1,53	0,34
VK	8,0	3,0	6,0	1,0

1581

Zusammenfassung
 aller Werte:
 n = 19
 x (ng/ml) = 21,91
 S = 1,58
 VK (%) = 7,0

niedrig liegenden Variationskoeffizienten von 8,0 %.

Entsprechende Untersuchungen in einer Milchprobe der Kuh "Rosi" zwischen dem 2.9.73 und 26.12.73 ergaben bei insgesamt 13 Doppelbestimmungen durchschnittlich 5,42 ng Progesteron pro ml Milch mit einer Standardabweichung von $\pm 0,32$ ng und einem Variationskoeffizienten von 5,9 %. Auch dieses Ergebnis ist als gut zu bezeichnen.

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich auch, daß zu häufiges Auftauen ein und der selben Milchprobe die Progesteronkonzentration negativ beeinflusste. Bei den Untersuchungen zur Überprüfung der Genauigkeit wurden daher die ursprünglich gewonnenen Milchmengen in kleinen Mengen abgefüllt.

3.3. Weiterentwicklung der beschriebenen Methodik zu einem Routineverfahren

Wie aus dem Ergebnisteil vorliegender Arbeit (s.Kap.4) hervorgeht, konnte mit der oben beschriebenen Methodik zur Bestimmung von Progesteron in der Milch vom Rind in eindeutiger Weise die Gelbkörperfunktion sowohl während des Zyklus als auch während der Frühträchtigkeit kontrolliert werden. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde, wie in Kapitel 5.2. ausführlich diskutiert wird, ein Verfahren zur Erstellung eines Frühträchtigkeitsnachweises beim laktierenden Rind vorgeschlagen. In diesem Zusammenhang wurden weitere Versuche angestellt, die zeigen sollten, ob es gelingt, die Methodik noch praktikabler zu machen, wobei insbesondere die Frage der Probenkonservierung und einer Verkürzung des Extraktionsganges und der Testauswertung angesprochen waren.

3.3.1. Konservierung der Milchproben

Bei Anwendung der beschriebenen Methodik im Feldversuch stellte sich zunächst das Problem, wie die Probe vom Tierhalter an das Zentrallabor geschickt werden kann, ohne dabei negativ beeinflusst zu werden. Aus Gründen der Praktikabilität war eine Verschickung in gefrorenem Zustand nicht möglich. Um die während eines langen Transportes von Frischmilch auftretende Gerinnung der Milch (nicht mehr pipettierbar) sowie einen möglicherweise stattfindenden enzymatischen Abbau von Progesteron (Enzyme bakteriellen Ursprungs - endogene Milchenzyme) zu kontrollieren, wurde folgender Versuch durchgeführt:

Aus dem Nachgemelk der Kuh "Kuni" wurden jeweils 10 ml Milch einmal sofort tiefgefroren und einmal bei Zimmertemperatur 4 Tage lang aufbewahrt. Parallel dazu wurden ebenfalls jeweils 10 ml bei Zimmertemperatur aufbewahrt, denen 12,5 bzw. 25 mg des Breitbandantibiotikums Chloramphenicol in Form des handelsüblichen Präparates Ertilen^R (Ciba) zugesetzt worden waren, bzw. 0,5 ml einer 0,2 molaren Titriplex^R-Lösung alleine sowie in Kombination mit Chloramphenicol.

Nach 4 Tagen wurde im Dreifachansatz in jeder Milchprobe die Progesteronkonzentration bestimmt. Das Ergebnis sowie der genaue Versuchsansatz sind in Tabelle 9 dargestellt.

Aus der Tabelle ist klar zu erkennen, daß durch Chloramphenicol in der niedrigsten Dosierung als auch durch Titriplex alleine eine Gerinnung der Milch verhindert wurde. (Hemmung von Laktobazillen durch Chloramphenicol, Hemmung durch Titriplex nach Ausfällung von Schwermetallionen). Die nicht behandelte Milch war geronnen, kaum mehr pipettierbar und ergab den niedrigsten Meßwert von 20,2 ng Progesteron pro ml Milch (25,8 ng $\hat{=}$ 100 % Wert).

Tab. 9 Versuchsplan und Ergebnisse der zur Konservierung von Milchproben durchgeführten Untersuchungen

Probenbehandlung (je 10 ml Milch)	Probenkonsistenz ^x	ng Progesteron pro ml Milch	Relative Pro- gesteronkonz. in %
sofort tiefgefroren	unverändert	25,8	100
+ 12,5 mg Chloramphenicol	unverändert	22,3	86,4
+ 25 mg Chloramphenicol	unverändert	25,2	97,4
+ 0,5 ml 0,2-molare Titriplex- lösung	unverändert	24,0	92,2
+ 12,5 mg Chloramphenicol + 0,5ml 0,2-molare Titriplexlösung	unverändert	24,1	93,2
+ 25 mg Chloramphenicol + 0,5ml 0,2-molare Titriplexlösung	unverändert	25,5	98,7
ohne Behandlung	geronnen, sehr schwer pipettierbar	20,2	78,0

x) subjektiver Eindruck

Quantitative Unterschiede in den Progesteronmeßwerten ergaben sich jedoch in Abhängigkeit vom Konservierungsmittel und der Dosierung von Chloramphenicol:

22,3 ng Progesteron / ml Milch bei 12,5 mg Chloramphenicol-Zusatz und 24 ng Progesteron / ml Milch ergaben sich bei Zusatz von 0,5 ml Titriplexlösung mit oder ohne 12,5 mg Chloramphenicol. Praktisch kein Unterschied in den Progesteronmeßwerten im Vergleich zu sofort tiefgefrorener Milch zeigten die Milchproben, die mit 25 mg Chloramphenicol plus 0,5 ml Titriplexlösung bzw. allein mit 25 mg Chloramphenicol behandelt worden waren.

Aufgrund dieses Versuches wurde für die Praxis die folgende Form der Probenkonservierung gewählt:

Ein 8 ml fassendes Plastikreagenzglas wird mit 25 mg Chloramphenicol (=0,1 ml Ertilen^R) versetzt, verschlossen und an den Tierhalter abgegeben. Um trotz der Konservierung der Milchprobe eine schnelle Zustellung der Proben zu gewährleisten, werden dem Tierhalter voradressierte Kartonagen ausgehändigt.

Aufgrund der Tatsache, daß 0,1 bis 0,2 ml Milch für eine Progesteronanalyse genügen, erscheint es auch denkbar, die notwendige Menge Milch auf genormtes Filterpapier aufzusaugen und dann an das Untersuchungslabor zu verschicken.

In einem Versuch sollte gezeigt werden, inwieweit ein solches Verfahren derzeit praktikabel ist.

In einem Vierfachansatz wurden je 0,2 ml frischer Vollmilch auf ein Filterpapier von der Größe 2x2 cm aufgetragen und anschließend extrahiert; parallel dazu wurden 4 mal 0,2 ml Milch ohne Filterpapier extrahiert. In ein und demselben Test wurde dann das Progesteron gemessen; es ergaben sich niedrigere Werte um ca. 5 %, die jedoch nicht signifikant waren,

bei den Proben, bei denen die Milch auf Filterpapier aufgetragen worden war.

Schwierigkeiten, auf die in vorliegender Arbeit nicht eingegangen werden konnte, dürften sich jedoch im Hinblick auf eine Antibiotikavorbereitung des Filterpapiers, der Kontamination verschiedenster Art im Stall und dem Versand des Papiers ergeben.

3.3.2. Versuche zur Kürzung des Extraktionsganges und zur rationellen Testauswertung

Hier bot sich zunächst an, den zeitraubenden Ausfrierschritt in Methanol zu verkürzen.

In einem Kontrollversuch wurden 12 mal 0,2 ml Milch mit je ca. 3600 dpm radioaktiven Progesterons versetzt und nach Ausführung des Extraktionsganges, wobei die mit destilliertem Methanol versetzten Proben lediglich zwei Stunden anstatt über Nacht bei -18°C belassen wurden, die Extraktionsausbeute bestimmt. Die Wiederfindung lag bei zweistündigem Ausfrieren bei 72,4 % ($\bar{s} = \pm 2,9$; $v = 4,0$ %) und war damit um ca. 11 % geringer als bei der Originalmethode. Aufgrund der Tatsache, daß bei größerer Probenzahl die Arbeitsgänge so eingeteilt werden konnten, daß diese verkürzte Extraktion keine Arbeitszeiterparnis gebracht hätte, wurde auch weiterhin der Ausfrierschritt über Nacht ausgeführt. Auch bei kleineren Probenzahlen wurde wegen der schlechteren Extraktionsausbeute auf eine Verkürzung des Ausfrierschrittes verzichtet.

Weitere Kürzungen des Progesteronbestimmungsverfahrens bieten sich hingegen zunächst in einer Verbesserung der Geräte an, wie z.B. die Verwendung automatischer Pipettiervorrichtungen, sowie durch eine vollautomatische Testauswertung mit einem Computer, wozu erste Schritte unternommen wurden.

3.4. Besondere Materialien und Reagenzien

Besondere Glaswaren:

Standardisierte Glasszintillationsküvetten (ca. 20 ml Inhalt mit Schraubverschlüssen aus Carbamidharz mit zinnfoliebeschichteter Korkeinlage) für die Extraktion wurden von der Fa. Zinser (Frankfurt) bezogen, die Einweg-Reaktionsgläser (AR-Glas, 100 x 16 mm und 75 x 14 mm) von der Fa. Kremer & Kreiler (München). Alle Einweg - Glaswaren wurden wie vom Hersteller geliefert verwendet.

Lösungsmittel:

Petroläther pa (Siedebereich 50 - 70°C; Merck), sowie Methanol pa (Merck) wurden vor Gebrauch destilliert. Dioxan reinst (Merck) wurde wie geliefert verwendet.

Reagenzien:

Phosphatpuffer, pH 7,2, setzte sich zusammen aus: 2,686 g KH_2PO_4 , 8,356 g Na_2HPO_4 und 0,352 g NaN_3 in 1 Liter Aqua bidest gelöst.

Phosphatpuffer mit RSA-Zusatz 0,1 %-ig:

1,0 g Rinderserumalbumin (RSA) Fa. Serva (Heidelberg) wurde in 1 Liter Phosphatpuffer (s.o.) gelöst.

Kohlesuspension:

2,0 g Holzkohle Norit A (Partikelgröße 40-70 μ) wurden in 1 Liter Aqua bidest, in dem bereits 0,2 g Dextran ($\text{MG} \approx 60\,000$ -90 000) gelöst waren, suspendiert. Beide Substanzen wurden von der Fa. Serva (Heidelberg) bezogen.

Szintillationschemikalien + Zubehör:

PFO (2,5-Diphenyloxazole) und POPOP (1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol) sowie Einweg-

Niederdruck-Polyäthylenzählküvetten wurden ebenfalls von der Fa.Zinser (Frankfurt) bezogen; Naphthalin für Fabrikationszwecke wurde wie vom Hersteller geliefert verwendet.

Die Szintillationsflüssigkeit (Bray's Solution) setzte sich wie bei Neill et al. (1967) angegeben aus 500 g Naphthalin, 35 g PPO und 1,5 g POPOP, gelöst in 5 Liter Dioxan,zusammen.

Standardsubstanzen:

Mit Tritium markiertes Progesteron (Progesteron-1,2,6,7- H^3 , spez. Aktivität 110 Ci/nM) wurde vom Radiochemical Centre Amersham bezogen.Die Identität und radiochemische Reinheit wurde durch Vergleichs- und Mischchromatogramme mit nicht markiertem Progesteron festgestellt (System Äther : Benzol = 2 : 1, Kieselgel).

Das nicht radioaktiv markierte Progesteron (Fa.Syntex, Palo Alto) wurde mit Hilfe von Papier- und Dünnschichtchromatographie sowie Schmelzpunktbestimmung auf seine Identität und Reinheit überprüft.

Besondere Geräte:

Schüttelautomat der Fa.Bühler (Tübingen) Typ Sm 2, Fassungsvermögen 120 Proben.

Dazu in der Werkstätte der Forschungsanstalt hergestellte Einsätze aus Aluminium mit Plastikhalterung für die Gläser; Fassungsvermögen je 40 Gläser.

Vakuumtrockenschrank der Fa.W.C.Heraeus (Hanau) Typ RVT 500, Temperatureinstellung 0-180°C, Vakuum-erzeugung über eine Wasserstrahlpumpe,Fassungsvermögen über 200 Proben.

3.5. Bestimmung des Fettgehaltes der Milch

Die Bestimmungen wurden vom Milchprüfing Bayern e.V., Milchuntersuchungsstelle Weißenstephan, geleitet von Herrn Stein, durchgeführt. Angewandt wurde das von Heiss (1971) beschriebene photometrische Verfahren.

3.6. Tiermaterial, Probennahmen und Versuchsplan

Aufgrund der Vielzahl der durchgeführten Tierversuche und der Variabilität des Tiermaterials muß in Bezug auf nähere Angaben auf den Ergebnisteil verwiesen werden.

Ein genau definiertes Tiermaterial stand lediglich für die eigenen kontrollierten Tierversuche an der Versuchsstation Veitshof zur Verfügung (s. Ergebnisteil). Die in Feldversuchen gewonnenen Proben stammten von Tieren unterschiedlicher Herkunft, eine Zuordnung zu Rasse und Alter war allgemein nicht mehr möglich.

Die Blutproben wurden durch Punktion der Vena jugularis gewonnen. Als Gerinnungshemmer wurde Heparin (100 I.E. pro 15 ml Blut) verwendet. Das durch Abzentrifugieren gewonnene Plasma wurde bis zum Gebrauch bei -18°C aufbewahrt.

Milchproben wurden im allgemeinen aus dem Nachgemelk entnommen, für spezielle Versuche wurden die Proben aus anderen Gemelksfraktionen gezogen. Bis zur Untersuchung wurde die Milch in Polyäthylen-Zählküvetten (Inhalt ca. 20 ml) bei -18°C aufbewahrt.

Handelsübliche Milchprodukte wurden käuflich erworben und direkt, also ohne vorheriges Einfrieren, verwendet.

Der Versuchsplan gliederte sich in vier Phasen, die wie folgt definiert werden können:

Phase 1:

Vergleichende Messungen von Progesteron in Plasma- und Milchproben während des Zyklus und der Früh-

trächtigkeit unter kontrollierten Bedingungen (Versuchstation Veitshof) an einem begrenzten Tiermaterial. In der Regel erfolgte hier die Entnahme der Proben in ein- bis zweitägigen Abständen (s. Ergebnisteil).

Phase 2:

Bestimmung der Progesteronkonzentration in vom Tierhalter während der Frühgravidität genommenen Milchproben in einem ersten Feldversuch und Versuche hinsichtlich der Korrelationen zwischen Progesterongehalt und Fettgehalt in der Milch zum Zwecke der Erstellung weiterer Beurteilungskriterien.

Phase 3:

In Zusammenarbeit mit dem Bayerischen Tiergesundheitsdienst Versuche zum Nachweis der Frühgravidität durch Bestimmung von Progesteron in Einzelgemelken, die vom Tierhalter am 20. Tag nach der Insemination bzw. nach der Belegung entnommen wurden.

Phase 4:

Ausdehnung des Progesteronbestimmungsverfahrens auf handelsübliche Milchprodukte.

4. E R G E B N I S T E I L

Mit den im methodischen Teil beschriebenen Arbeitsgängen wurden die Progesteronkonzentrationen im peripheren Blut und in der Milch von Kühen, sowie in einer Reihe im Handel befindlicher Milchprodukte bestimmt. Die Ergebnisse sind größtenteils in graphischer Form dargestellt, die zugehörigen Meßwerte sind in Form eines Tabellenanhanges (Tab. 17 - 35) wiedergegeben.

4.1. Progesteronkonzentrationen in Plasma und Milch von Kühen während Zyklus und Frühgravidität

4.1.1. Untersuchungen von Nachgemelksproben und Plasma

In diesem Kapitel sind die Untersuchungsergebnisse der sog. Phase 1 des Versuchsplanes dargelegt. Tabelle 10 gibt eine Zusammenstellung der Tiere, die für diese Versuchsreihe herangezogen wurden und den Zeitraum der Probennahmen.

Das erste Tier, bei dem parallel Blutplasma und Nachgemelk auf Progesteronkonzentrationen untersucht wurden, war die Kuh "Laro". Das Tier war bereits mehrfach besamt worden; zur Zeit der sechsten Nachbesamung wurde mit den Probennahmen begonnen.

Das Ergebnis der Progesteronbestimmung zeigt Abbildung 10; in der ansteigenden Progesteronkonzentration sowohl im Plasma als auch in der Milch ist die Anbildung des Gelbkörpers deutlich zu erkennen. Etwa ab dem 8. Tag nach der Insemination wird ein erhöhtes Plateau erreicht; der drastische Abfall der Progesteronkonzentration, wiederum gleichverlaufend in Milch und Plasma, ab dem 20. Tag zeigt, daß eine Luteolyse eingesetzt hat;

Tab. 10 Versuchstiere (Versuchsstation Veitshof) und Zeitraum der Proben-
nahmen in der ersten Versuchsphase

Kuh	Alter (Jahre)	Rasse	Zeitraum der Probenahmen (Datumsangaben 1973)	
			Zyklusperioden vor der Gravidität	Frühgravidität
Laro	4	BV	19.3. - 13.4. ^x	
Adria	12	SB		3.2. - 9.3.
Roci	8	BV		19.2. - 25.3.
Rojo	4	BV		6.2. - 9.3.
Rowido	4	BV	11.3. - 31.3.	31.3. - 23.4.
Kakwiro	4	BV	27.1. - 17.2.	17.2. - 18.3.
Nyschlos	4	BV	23.3. - 12.4.	12.4. - 25.6.
Kalma	3	BV	11.4. - 30.4.	22.5. - 16.6.
Rolino	7	BV	1.4. - 23.4.	15.5. - 15.6.
Ronie	5	BV	2.4. - 23.4.	15.5. - 15.6.

SB = Schwarzbunt, BV = Braunvieh

x) 6. Insemination, die Kuh ist nicht trächtig geworden und wurde abgemolken

das Tier ist auch nach dieser Insemination nicht trächtig geworden. Die Progesteronwerte zeigen einen typischen, wenn auch etwas verlängerten Zyklus.

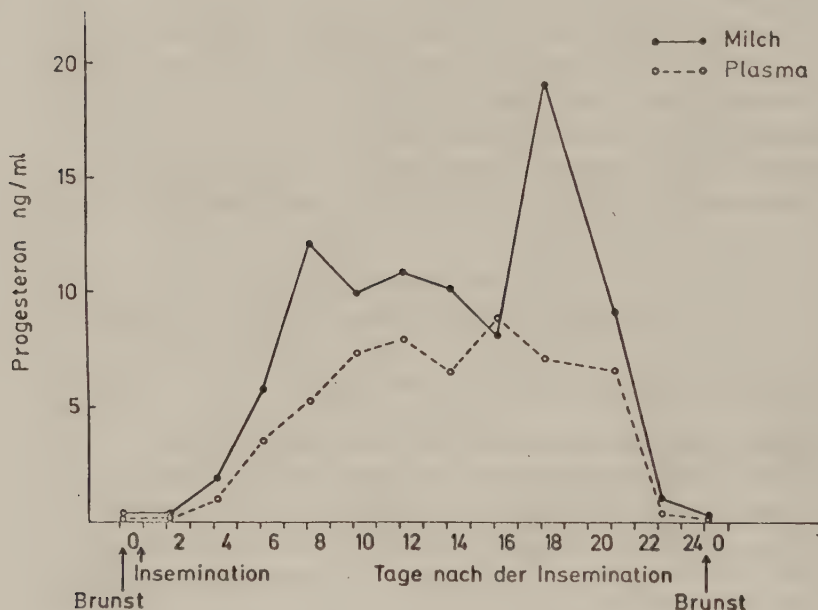


Abb. 10a Progesteronkonzentrationen in peripherem Blutplasma und Nachgemelk der Kuh "Laro" während eines Zyklus nach erfolgter Insemination

Auffallend war, daß bei gleichzeitigen Probennahmen - mit Ausnahme eines einzigen Meßpunktes - in der Milch stets höhere Progesteronwerte als im Plasma gemessen wurden. So stiegen im Plasma die Progesteronwerte von 0,1 ng bis auf maximal 8,75 ng Progesteron pro ml, im Nachgemelk dagegen von Minimalwerten um 0,3 ng bis auf einen Maximalwert von 18,75 ng Progesteron pro ml. Beim Vergleich des Verlaufs der Progesteronkonzentrationen im Plasma und im Nachgemelk ergab sich eine gesicherte positive Korrelation ($r = 0,84; p < 0,001$).

Diese Tendenz der höheren Progesteronkonzentration in der Milch im Vergleich zu Plasma zeigte sich auch in den nächsten drei untersuchten Fällen, wie aus den Abbildungen 11, 12 und 13 hervorgeht. Hier ergaben sich lediglich bei drei Proben der Kuh "Adria" niedrigere Meßwerte im Nachgemelk im Vergleich zu Plasma. Von allen untersuchten Tieren wies diese Kuh die niedrigsten Progesteronwerte im Nachgemelk auf, was wohl auf den schlechten Grad des Ausmelkens (das Euter dieser Kuh ist für das Maschienenmelken nicht geeignet) zurückzuführen war (s. Kap. 4.3.1.).

Wie bei dem 1. Fall (Kuh "Laro") fiel auch bei den nächsten drei Tieren der Beginn der Probennahmen mit der Insemination zusammen. Bei allen drei Tieren ist hier jedoch um den 19. bis 23. Tag nach der Insemination keine Brunst mehr beobachtet worden; hohe Progesteronwerte zu dieser Zeit in Plasma und Nachgemelk geben einen weiteren Hinweis darauf, daß bei diesen Tieren eine Trächtigkeit eingetreten ist. Die Konzeption infolge dieser Besamung hat sich inzwischen auch durch das Abkalbeergebnis bestätigt.

Bei der Kuh "Adria", die am 1.2.73 abends Brunstsymptome zeigte und am 2.2.73 morgens künstlich besamt wurde, stiegen die Progesteronkonzentrationen im Plasma von 0,2 ng/ml am Tag der Insemination auf 7,25 ng/ml am 15. Tag danach. In dem weiter erfaßten Zeitraum (bis zum 35. Tag post inseminationem) verliefen die Progesteronkonzentrationen in Plasma etwa konstant auf diesem Niveau. In der Milch war zunächst ein Progesteronanstieg von 0,75 ng/ml am Tag der Insemination auf 7,1 ng 15 Tage später festzustellen. Danach folgte eine mehrere Tage lang anhaltende Phase stark schwankender Werte zwischen 4,5 ng und 10,5 ng Progesteron pro ml Milch; am 35. Tag wurde mit 18,3 ng/ml die höchste Progesteronkonzentration im Nachgemelk gemessen.

(Verlauf der Progesteronkonzentrationen in Plasma und Milch mit $r = 0,76$ bei $p < 0,001$ gesichert positiv korreliert.)

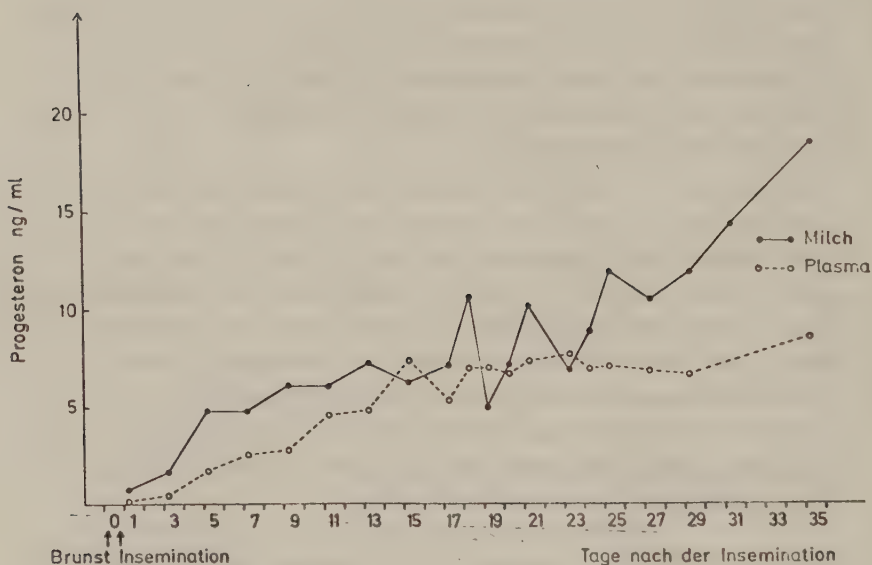


Abb. 11 Progesteronkonzentrationen in peripherem Blutplasma und Nachgemelk der Kuh "Adria" während der Frühgravidität

Ähnlich wie bei der Kuh "Adria" wurden auch im Plasma der Kühe "Roci" und "Rojo" (s. Abb. 12 und 13) ab dem 16. und 17. Tag nach der Besamung relativ konstante Progesteronwerte im Plasma gemessen ("Roci" um 7,2 ng/ml; "Rojo" um 8,5 ng/ml).

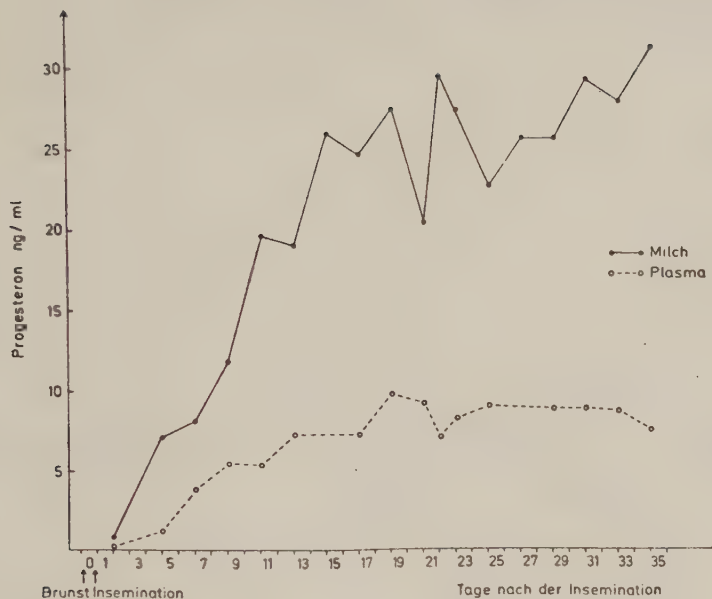


Abb. 12 Progesteronkonzentrationen im peripheren Blutplasma und Nachgemelk der Kuh "Roci" während der Frühgravidität

Bei beiden Tieren ergab sich nach einem relativ schnellen Anstieg der Progesteronkonzentrationen im Nachgemelk von 0,75 bzw. 0,3 ng/ml auf 24,75 bzw. 13,0 ng/ml am 15. Tag nach der Besamung bis zum Ende der Untersuchungsperiode ein etwa gleichbleibendes Niveau der Progesteronwerte.

Eine Berechnung der Korrelationskoeffizienten für den Vergleich des Verlaufs der Progesteronwerte in Plasma und Nachgemelk ergab Werte für r von 0,87 bei der

Kuh "Roci" bzw. von 0,82 bei der Kuh "Rojo"; damit zeigten sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p(0,001)$ eine gesicherte Übereinstimmung der Parameter.

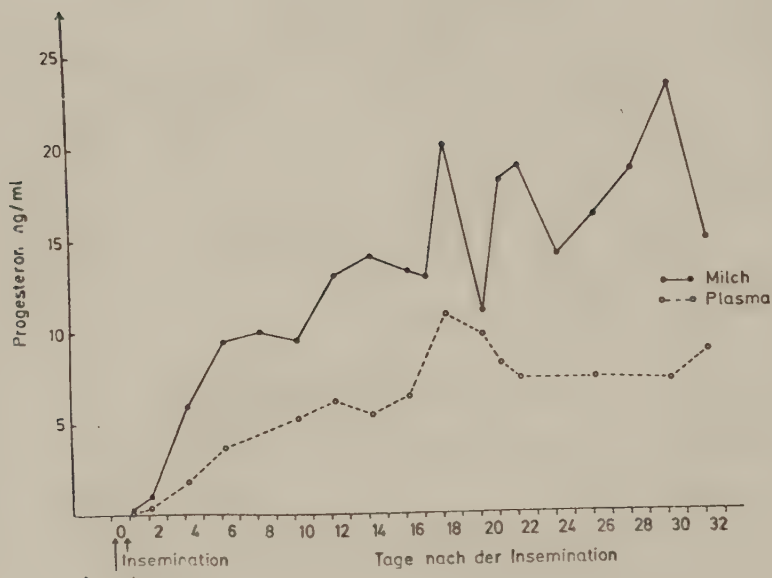


Abb. 13 Progesteronkonzentrationen in peripherem Blutplasma und Nachgemelk der Kuh "Rojo" während der Frühgravidität

In einem weiteren Fall wurden die Progesteronkonzentrationen in Plasma und Nachgemelk der Kuh "Rowido" zunächst während eines 20-tägigen Zyklus und dann in der sich anschließenden Frühträchtigkeit bis zum Tag 28

post inseminationem gemessen; die Kuh hat am Abend des 11.3.73 deutliche Brunstsymptome gezeigt, worauf nach 20 Tagen, am 31.3.73, eine erneute Brunst beobachtet wurde. Am selben Tag wurde die Kuh künstlich besamt. das Ergebnis der Progesteronbestimmungen ist in der Abbildung 14 dargestellt.

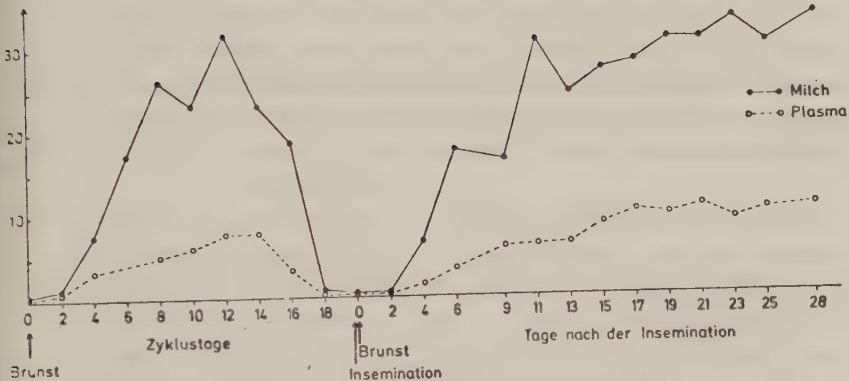


Abb. 14 Progesteronkonzentrationen in peripherem Blutplasma und Nachgemelk der Kuh "Rowido" während eines Zyklus und der anschließenden Frühgravidität

Auch hier zeigte sich wieder eine gute Übereinstimmung im Verlauf der Progesteronkonzentrationen in Plasma und Milch sowohl während des Zyklus als auch in der

Gravidität. (Die korrelationskoeffizienten bei Vergleich des Verlaufs der Progesteronkonzentrationen in Plasma und Nachgemelk liegen bei $r = 0,94$ während des Zyklus und $r = 0,93$ während der Frühgravidität.)

Im plasma wurden Werte von 0,25 ng bis 7,7 ng Progesteron pro ml während des Zyklus und 0,3 bis 11,25 ng Progesteron pro ml in der Frühgravidität gemessen. Wiederum sehr viel höhere Werte ergaben sich im Nachgemelk; die Konzentrationen während des Zyklus stiegen von min. 0,5 ng auf max. 31,25 ng Progesteron pro ml und von min. 0,5 ng bis auf max. 32,75 ng Progesteron pro ml während der Frühgravidität. Hohe Progesteronwerte in Plasma und Milch zwischen den Tagen 19 und 23 nach der Insemination sprechen für den Erfolg der Besamung. Diese Aussage wurde durch eine später durchgeführte rektale Untersuchung sowie durch die in- zwischen termingerecht von staten gegangene Abkalbung gerechtfertigt.

Entsprechende Untersuchungen wie bei der Kuh "Rowido" wurden bei den Kühen "Kakwiro" und "Nyschlos" durchgeführt. Bei der Kuh "Kakwiro" wurde am 27.1.73 abends eine Brunst beobachtet; am 16.2.73 wurden wieder Brunstsymptome registriert, worauf am 17.2.73 morgens eine Insemination vorgenommen wurde. Anzeichen für ein Nachrindern wurden nicht beobachtet.

Bei der Kuh "Nyschlos" wurde am Abend des 20.3.73 eine erste Brunst beobachtet. Am 12.4.73 hat die Kuh wieder gerindert, worauf am 13.4.73 morgens inseminiert wurde. Auch hier wurden keine Anzeichen für ein Nachrindern wahrgenommen.

Das Ergebnis der Progesteronbestimmungen bei beiden Tieren im peripheren Blutplasma und im Nachgemelk zeigen die Abbildungen 15 und 16.

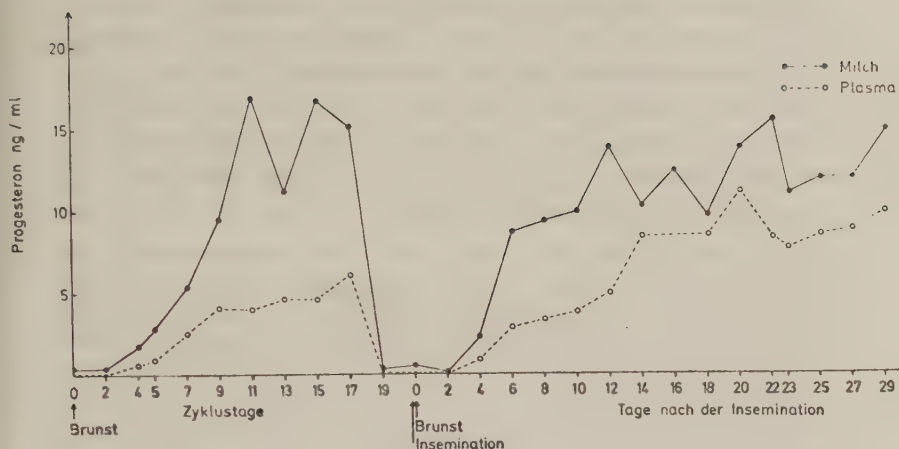


Abb. 15 Progesteronkonzentrationen in peripherem Blutplasma und Nachgemelk der Kuh "Kakwiro" während eines Zyklus und der anschließenden Frühgravidität

Für die Progesteronkonzentrationen im Blutplasma ergibt sich auch hier das bekannte Bild einer normalen Progesteronverlaufskurve während des Zyklus sowie etwa gleichbleibender Progesteronkonzentrationen etwa ab dem 15.Tag nach der Besamung bei eingetretener Konzeption. Die Größenordnung der Absolutwerte stimmt mit den bisher erzielten Ergebnissen (s. Abbildungen 15 und 16) überein. Bei beiden Tieren zeigten sich auch hier wieder signifikant höhere Progesteronkonzentrationen in der Milch im Vergleich zu Plasma.

Bei Berechnung der Korrelationskoeffizienten bei Vergleich der Progesteronverlaufskurven in Plasma und Milch ergibt sich mit Werten von $r = 0,94$ für den Zyklus und $r = 0,86$ für die Frühgravidität bei der Kuh "Kakwiro" eine hochsignifikant gesicherte Über-

einstimmung ($p < 0,001$), ebenso wie für den Zyklus der Kuh "Nyschlos" ($r = 0,94$). Bei Anstellung des gleichen Vergleiches während der Frühträchtigkeit der Kuh "Nyschlos" ergibt sich mit 0,74 ein deutlich niedriger liegender Wert für r , wobei sich aber bei der Anzahl der Stichproben mit $p < 0,01$ doch noch eine gesicherte positive Übereinstimmung ergibt.

Dieser niedrigere Wert für r ist hier insbesondere darauf zurückzuführen, daß im Nachgemelk die Werte am 16. Tag nach der Besamung bis auf 38,5 ng Progesteron pro ml Milch ansteigen und ab dem 19. Tag wieder auf 18,0 ng Progesteron pro ml Milch abfallen. Von da an verlaufen sie bis zum 43. Tag nach der Insemination relativ konstant. Die Konzentration von 38,5 ng Progesteron pro ml Milch, gemessen am 16. Tag nach der Insemination, stellt den absolut höchsten in einem Nachgemelk gemessenen Wert dar.

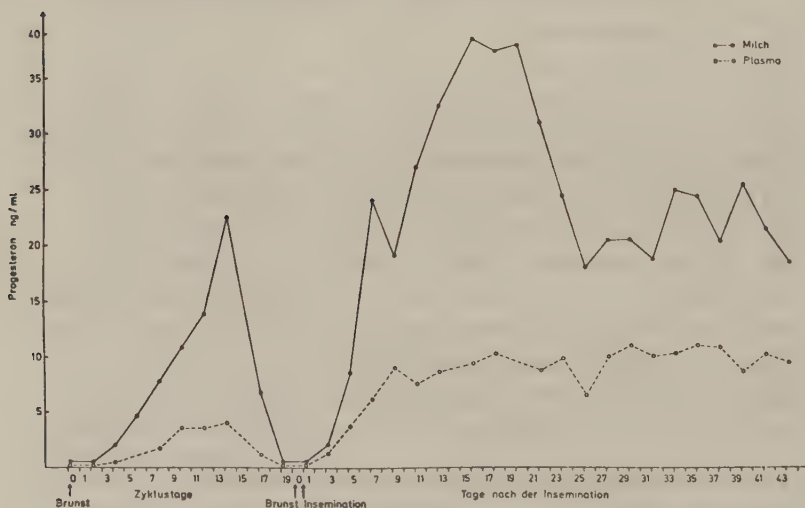


Abb. 16 Progesteronkonzentrationen in peripherem Blutplasma und Nachgemelk der Kuh Nyschlos während eines Zyklus und der anschließenden Frühgravidität

Bei den folgenden drei Experimenten handelt es sich jeweils um Kühe, bei denen sowohl eine eingetretene Frühgravidität als auch die zwei vorausgehenden Zyklen analytisch erfaßt wurden. Hierbei wurden die Tiere teilweise bewußt nicht besamt, teilweise führten die Inseminationen nicht zu einer Konzeption; in einem Fall wurde eine Behandlung des Uterus mit Antibiotika durchgeführt.

In der Abbildung 17 sind die Ergebnisse der Progesteronbestimmungen in Plasma und Nachgemelk der Kuh "Rolino" graphisch dargestellt. Die erste deutliche Brunst ist am Morgen des 1.4.73, sechs Wochen nach der Geburt, beobachtet worden. Die Kuh wurde zu diesem Zeitpunkt noch nicht besamt. Daraufhin trat nach 22 Tagen am 23.4.73 eine erneute Brunst auf, worauf eine Insemination vorgenommen wurde. Trotzdem wurden nach 22 Tagen am 15.5.73 erneut Brunstsymptome deutlich, die mit niederen Progesteronwerten in Plasma und Milch einhergingen. Nach einer erneuten Insemination am 15.5.73 ist, wie auch die spätere rektale Trächtigkeitskontrolle zeigte, eine Gravidität eingetreten.

Die Werte im Plasma steigen von durchschnittlich 0,15 ng Progesteron / ml während der Brunst auf mehr als 8,0 ng Progesteron / ml während der Blüte des Corpus luteum in der zweiten Zyklushälfte bzw. ab dem 15. Tag der Frühgravidität an.

Im Nachgemelk liegen die entsprechenden Werte bei ca. 0,75 ng Progesteron / ml während der Brunst bzw. einheitlich zwischen ca. 25 und 30 ng Progesteron / ml Milch während der zweiten Zyklushälfte bzw. ab dem 11. Tag der Frühgravidität.

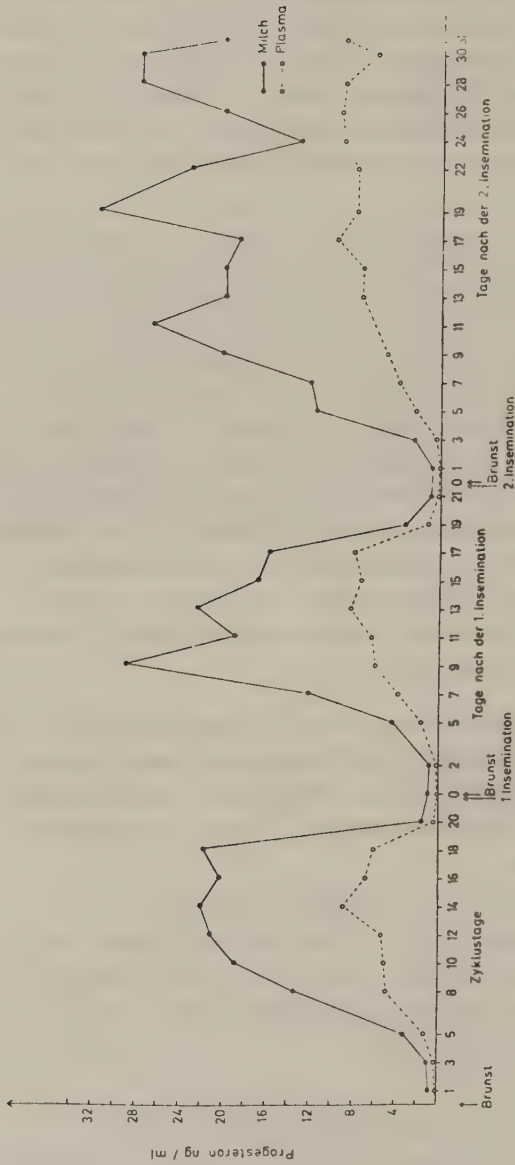


Abb 17 Progesteronkonzentrationen in peripherem Blutplasma und Nachgemelk der Kuh "Rolino" während zweier Zyklen und der anschließenden Frühgravidität

Die Abbildung 18 zeigt die Progesteronkonzentrationen in peripherem Blutplasma und Nachgemelk der Kuh "Ronie". Das Tier hat 32 Tage nach der Geburt am 2.4.73 wieder gerindert. Die Insemination wurde allerdings erst bei der darauffolgenden Brunst (Brunstbeginn am 22.4.73) 20 Tage später am 23.4.73 durchgeführt. Nach dieser Besamung hat die Kuh nach 21 Tagen am 14.5.73 wieder Brunstsymptome gezeigt. Auf eine am 15.5.73 erfolgte zweite Insemination ist die Kuh tragend geblieben.

Einheitlich wurden auch hier die niedrigsten Progesteronwerte in Plasma und Milch während der Brunst gemessen, die bei durchschnittlich 0,1 ng Progesteron / ml Plasma und 0,6 ng Progesteron / ml Nachgemelksmilch lagen. Die während des Zyklus und der Frühgravidität gemessenen Maximalwerte im Plasma lagen im Durchschnitt bei 7,0 ng Progesteron / ml und im Nachgemelk einheitlich bei ca. 29 ng Progesteron / ml.

Die bei der Kuh "Kalma" gemessenen Progesteronkonzentrationen in Plasma und Nachgemelk sind in der Abbildung 19 dargestellt.

Die Kuh wurde in der ersten Brunst nach der Geburt am 11.4.73 künstlich besamt. Da sie nach 19 Tagen am 30.4.73 wieder gerindert hat und als Ursache für die unterbliebene Konzeption eine entzündliche Erscheinung des Uterus festgestellt wurde, ist die Kuh zu diesem Zeitpunkt therapeutisch versorgt worden. 22 Tage danach ist am Abend des 21.4.73 wieder eine Brunst aufgetreten, wonach die Kuh am Morgen des folgenden Tages nachbesamt wurde und, wie auch das Ergebnis der Progesteronbestimmung in Plasma und Milch zeigt, trächtig geworden ist.

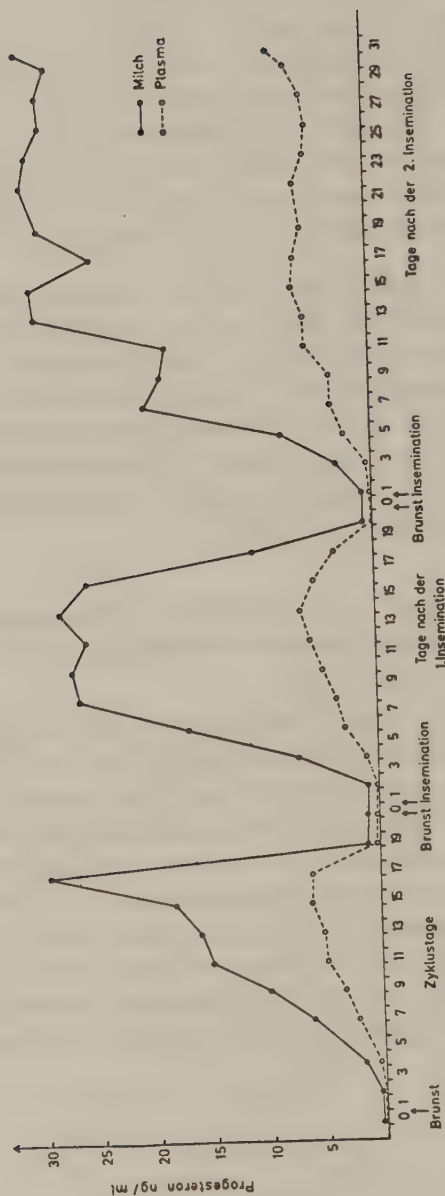


Abb. 18 Progesteronkonzentrationen in peripherem Blutplasma und Nachgemelk der Kuh "Ronie" während zweier Zyklen und der anschließenden Frühgravidität

Die Progesteronkonzentrationen im Plasma differierten zwischen 0,1 ng Progesteron / ml zur Zeit der Brunst und 6,4 ng Progesteron / ml in der zweiten Zyklushälfte des ersten Zyklus; entsprechend lagen die Werte zwischen 0,1 ng und 8,5 ng Progesteron / ml Plasma während des zweiten Zyklus. In der erfaßten Frühträchtigkeit stieg die Progesteronkonzentration im Plasma auf 10,75 ng Progesteron / ml am 12. Tag an.

Im Nachgemelk wurden in den zum gleichen Zeitpunkt entnommenen Proben Werte zwischen 0,5 ng und 25,5 ng Progesteron / ml während des ersten Zyklus, zwischen 0,5 und 24,4 ng Progesteron / ml während des zweiten Zyklus bzw. von maximal 26,0 ng Progesteron / ml am 17. Tag der Frühträchtigkeit festgestellt.

Die gesicherten, positiv korrelierten Beziehungen zwischen den Progesteronkonzentrationen im Plasma und den Progesteronkonzentrationen im Nachgemelk dieser drei Kühe bringt die Berechnung der Korrelationskoeffizienten deutlich zum Ausdruck.

Bei der Kuh "Rolino" errechnete sich ein Wert von $r = 0,91$ ($p < 0,001$) während der beiden Zyklusperioden und von $r = 0,70$ ($p < 0,01$) während der Frühgravidität. Bei der Kuh "Ronie" lagen die entsprechenden Werte bei $r = 0,91$ ($p < 0,001$) bzw. $r = 0,94$ ($p < 0,001$) und bei der Kuh "Kalma" bei $r = 0,92$ ($p < 0,001$) (Zyklusperioden) bzw. $r = 0,88$ ($p < 0,001$) (Frühgravidität).

In diesen Versuchen zeigte sich wieder, daß bei allen drei Tieren höhere Progesteronkonzentrationen im Nachgemelk als im Blutplasma gemessen wurden.

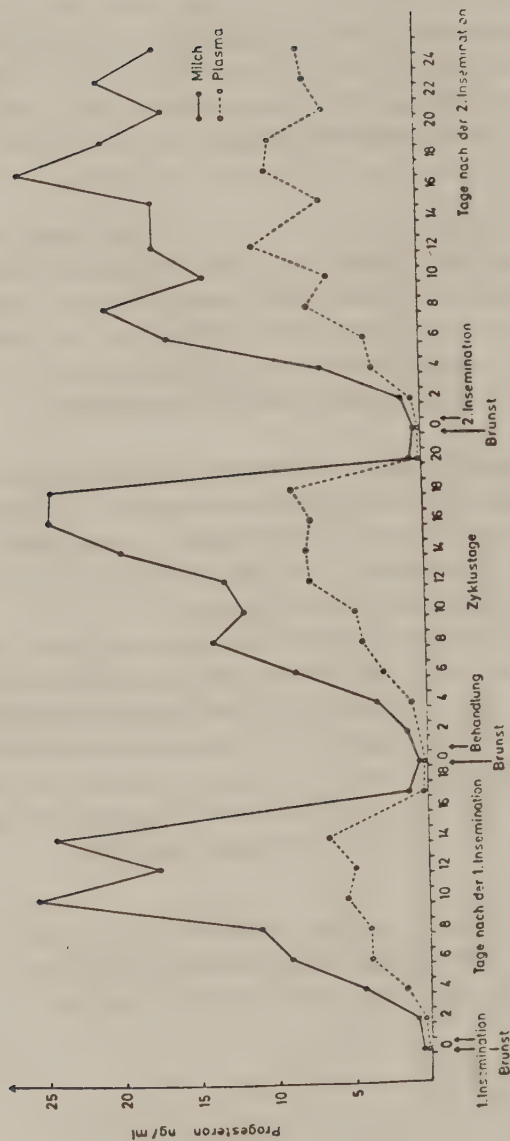


Abb. 19 Progesteronkonzentrationen in peripherem Blutplasma und Nachgemelk der Kuh "Kalma" während zweier Zyklen und der anschließenden Frühgravidität

4.1.2. Untersuchungen von Gesamtgemelksproben und Plasma

Bei den bisher beschriebenen Untersuchungen über die Erfassung von Progesteron in der Milch wurden die Bestimmungen stets im Nachgemelk durchgeführt. Dies geschah notwendigerweise aus versuchstechnischen Gründen, da die zur Verfügung stehenden Tiere in einem Melkstand mit Absaugleitung gemolken wurden.

Zu Vergleichszwecken erschien es nun interessant, die Progesteronbestimmung auch einmal im Gesamtgemelk durchzuführen, zumal ja bekannt ist, daß sich die Milchzusammensetzung im Verlauf des Melkvorganges ändert; so steigt der Fettgehalt an, während der Proteinanteil abnimmt (Johannson et al. 1952).

Die Untersuchungen wurden bei der Kuh "Anni" durchgeführt, das Ergebnis der Bestimmung von Progesteron in peripherem Blutplasma und Gesamtgemelk ist in der Abbildung 20 dargestellt.

Die Kuh hatte am 23.4.73 gerindert. Da infolge einer vorausgegangenen Schweregeburt das Tier relativ stark abgemagert war, wurde die Besamung erst nach einem weiteren 21-tägigen Zyklus am 15.5.73 durchgeführt, worauf eine Trächtigkeit eingetreten ist.

Die Progesteronkonzentrationen im Plasma erstreckten sich über einen Bereich von 0,1 ng bis 5,6 ng Progesteron / ml während des Zyklus und von 0,1 ng bis 10,4 ng Progesteron / ml während der Frühträchtigkeit.

Im Gesamtgemelk lagen die entsprechenden Werte bei 0,25 ng bis 22,9 ng Progesteron / ml während des Zyklus und bei 0,25 ng bis 26,0 ng Progesteron / ml in der Frühträchtigkeit.

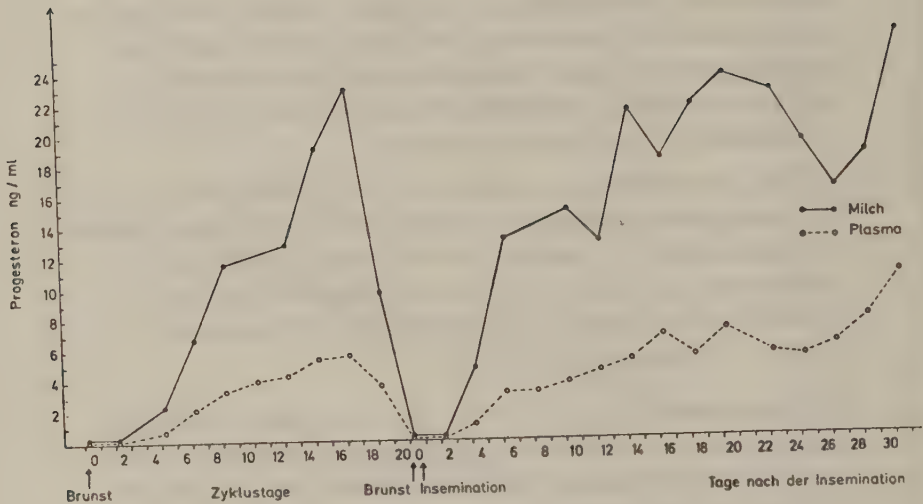


Abb. 20 Progesteronkonzentrationen in peripherem Blutplasma und Gesamtgemelk der Kuh "Anni" während eines Zyklus und der anschließenden Frühgravidität

Es zeigen sich ähnliche Verhältnisse wie bei der Bestimmung von Progesteron im Nachgemelk, sowohl was die Größe der Absolutwerte betrifft, als auch was die höheren Progesteronwerte in der Milch im Vergleich zu Plasma angeht.

Bei diesem Tier ergaben sich für die Übereinstimmung des Verlaufs der Progesteronkonzentrationen in Plasma und Milch mit $r = 0,99$ während des Zyklus und $r = 0,95$ während der Frühgravidität die bisher besten Korrelationskoeffizienten.

4.2. Bestimmung der Progesteronkonzentrationen zum Frühträchtigkeitsnachweis im Rahmen eines ersten Feldversuches

Im Rahmen von ersten Feldversuchen wurden in der sog. Phase 2 des Versuchsplanes von 6 Kühen auf Höfen in der Umgebung Freising's aus den Nachgemelken Proben im Anschluß an Inseminationen entnommen.

Nachdem in den vorausgehenden Versuchen (s.Kap. 4.1.), in Übereinstimmung mit den Plasmawerten, auch in der Milch bei eingetretener Gravidität hohe Progesteronwerte während der Tage 19 bis 23 nach der Insemination gefunden wurden (Umstellung vom Corpus luteum periodicum zum Corpus luteum graviditatis), sollten bei diesen Feldversuchen erste Anhaltspunkte über die Praktikabilität eines Frühgraviditätsnachweises mittels Bestimmung von Progesteron in der Milch gewonnen werden.

Das Ergebnis der Untersuchungen ist in den Abbildungen 21 und 22 dargestellt.

Die Abbildung 21 zeigt den Verlauf der Progesteronkonzentrationen im Nachgemelk bei den Kühen "Ria", "Kuni" und "Rosi". Einheitlich wurden bei den drei Tieren zum Zeitpunkt der Insemination niedrige Werte zwischen 0,25 ng Progesteron / ml (Kuh "Kuni") und 0,75 ng Progesteron / ml Nachgemelksmilch (Kuh "Ria") gemessen. Die Konzentrationen stiegen dann bis zum 10. bzw. 13. Tag nach der Insemination an und zeigten danach einen mehr oder weniger konstanten Verlauf während der restlichen Untersuchungsperiode.

Tab. 12 Progesteronbestimmung im Nachgemelk: 1. Feldversuch, Tiermaterial
und Versuchsdaten

Kuh	Alter (Jahre)	Rasse	Brunstbeobachtung	Insemination	Zeitraum der Probennahmen	Anzahl Tage
Ria	3	Hfl	2.7.73	3.7.73	3.7. - 28.7.73	26
Kuni	3	SB	11.7.73	11.7.73	12.7. - 8.8. 73	27
Rosi	3	Hfl	11.7.73	11.7.73	12.7. - 8.8. 73	27
Nelly	4	SB	22.3.73	23.3.73	23.3. - 21.4.73	29
Alma	4	Hfl	10.4.73	11.4.73	11.4. - 2.5.73	22
Rosa	5	Hfl	16.2.73	17.2.73	19.2. - 15.3.73	25

SB = Schwarzbunt

Hfl = Höhenfleckvieh

Die zwischen dem 17. und 21. Tag nach der Insemination gemessenen hohen Werte (Kuh "Ria" 18,1 bis 27,9, Kuh "Kuni" 17,0 bis 28,3, Kuh "Rosi" 10,75 bis 16,0 ng Progesteron / ml Milch) lassen auf eine eingetretene Frühgravidität schließen.

Dieser durch die Progesteronbestimmung in der Milch erhobene Befund wurde 4 Monate später bei allen drei Tieren durch die rektale Untersuchung bestätigt.

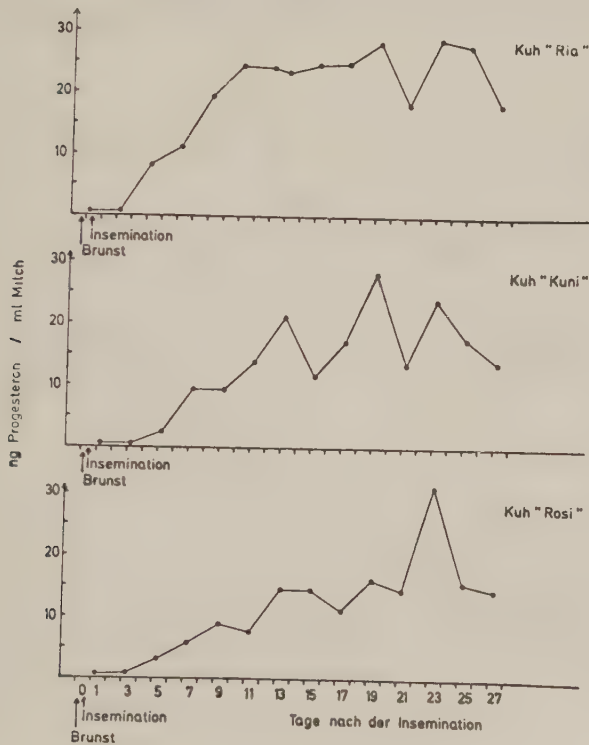


Abb. 21 Progesteronkonzentrationen im Nachgemelk der Kühe "Ria", "Kuni" und "Rosi" im Anschluß an eine Insemination

In Abbildung 22 ist das Ergebnis der Progesteronbestimmungen in Nachgemelken nach der Insemination bei den Kühen "Rosa" und "Nelly" dargestellt, die 5 bzw. 4 Jahre alt waren.

Während das Ergebnis bei der Kuh "Rosa" dem oben (s. Abb. 21) dargestellten Verlauf der Progesteronkonzentrationen entspricht (Progesteronwerte zwischen den Tagen 17 bis 21 nach der Insemination zwischen 18,5 ng und 30,0 ng Progesteron pro ml Milch), zeigt sich bei der Kuh "Nelly" ein Einbruch in den Progesteronwerten zwischen dem 12. und 25. Tag nach der Besamung.

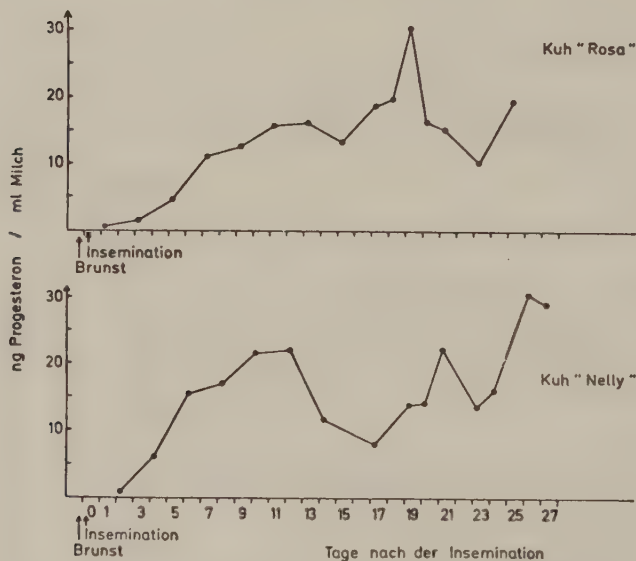


Abb. 22 Progesteronkonzentrationen im Nachgemelk der Kühe "Rosa" und "Nelly" im Anschluß an eine Insemination

Die Progesteronkonzentrationen im Nachgemelk fallen von 22,0 ng Progesteron / ml am 12.Tag auf 8,0 ng Progesteron / ml am 17. Tag ab; am 26. Tag nach der Besamung wurde wieder eine relativ hohe Konzentration von 30,5 ng Progesteron / ml Nachgemelk gemessen.

Aufgrund dieser Befunde wurde bei der Kuh "Rosa" und - allerdings zunächst mit etwas Zweifel^x - auch bei der Kuh "Nelly" auf eine eingetretene Gravidität geschlossen. Diese Befunde konnten später aufgrund rektaler Trächtigkeitsdiagnosen bzw. aufgrund der Abkalbungen bestätigt werden.

Das Ergebnis der Progesteronbestimmung bei der vier Jahre alten Kuh "Alma" weist einige Besonderheiten auf.

Wie die Abbildung 23 zeigt, wurden im Nachgemelk in den ersten 15 Tagen nach der Insemination gleichbleibend niedrige Progesteronkonzentrationen um 0,5 ng / ml Milch gemessen; am 17. und 18. Tag danach erhöhte sich die Konzentration kurzfristig auf 5,2 bzw. 3,9 ng Progesteron / ml, am 19., 20. und 21. Tag liegen die Werte im Nachgemelk wieder bei 0,5 ng pro ml Milch.

Nach Angaben des Besitzers hatte das Tier während dieser Zeit mehrmals Brunstsymptome gezeigt, nämlich am 5. und 11. Tag nach der Insemination. Die vom Besitzer geäußerten Zweifel einer stattgefundenen Konzeption wurde durch die Progesteronbestimmung bestätigt. Es lag hier zweifellos eine Störung der ovariellen Funktion vor.

x) siehe dazu Kapitel 4.3.2.

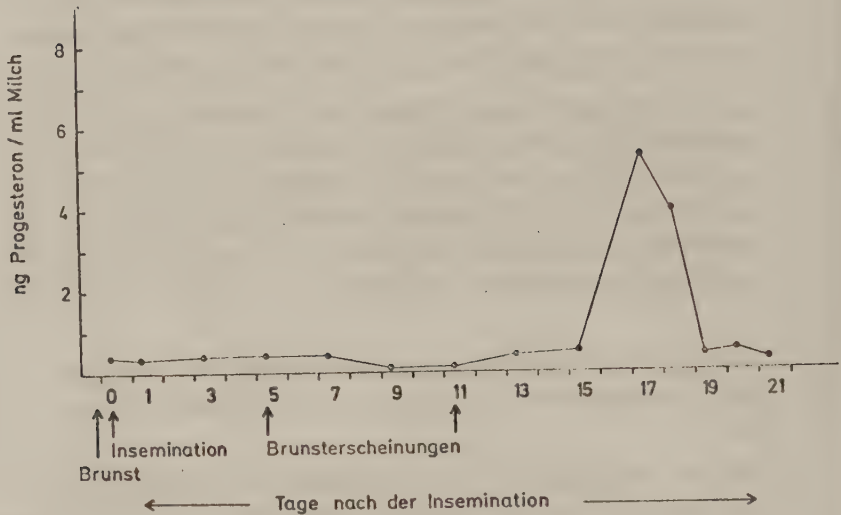


Abb. 23 Progesteronkonzentrationen im Nachgemelk der Kuh "Alma" mit Störung der Funktion des Ovars

4.3. Korrelationen zwischen Progesterongehalt und Fettgehalt der Milch

4.3.1. Veränderungen der Progesteronkonzentrationen und des Fettgehaltes in der Milch während des Melk-
vorganges

Zu den nachfolgenden Untersuchungen gab folgende Beobachtung Anlaß:

Im Bereich der hohen Progesteronkonzentrationen in der Milch traten teilweise starke Schwankungen von Probe zu Probe auf, die aufgrund der Zuverlässigkeit der Methode nur von der Beschaffenheit der untersuchten

Milchproben abhängig sein konnten. Für diese Annahme sprach auch der Befund der gleichmäßiger verlaufenden Progesteronwerte in Plasma (soweit dieses gewonnen wurde) im Vergleich zur Milch. Da, soweit es sich um Nachgemelksproben handelte, der Grad des Ausmelkens den Fettgehalt der Milchprobe bestimmte, war mit relativ starken Fettgehaltsschwankungen zu rechnen. Da es sich bei Progesteron um eine stark lipophile Substanz handelt, war zu vermuten, daß - abhängig vom MilCHFettgehalt - Unterschiede in der Progesteronkonzentration auftreten können.

So hat sich ja in einigen Vorversuchen (s.S. 33) gezeigt, daß bei Abtrennung des Fettanteiles der Milch zugesetztes radioaktives Progesteron vornehmlich in diesem Teil verbleibt.

Aufgrund der Tatsache, daß während des Melkvorganges der Fettgehalt der Milch ansteigt, wurden jeweils drei Proben (Anfang, Mitte, Ende der Melkzeit) von zwei in der Gelbkörperphase des Zyklus befindlichen Kühen auf Progesteron untersucht. Tabelle 13 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung.

Tab. 13 Progesteronkonzentrationen in Gemelksfraktionen von zwei Kühen ("Olga" und "Rondo")

	ng Progesteron pro ml		
	Anfangs-	Mitte-	Endgemelk
Kuh			
"Olga"	3,37	5,75	10,00
"Rondo"	4,25	12,50	20,50

Aus der Tabelle geht hervor, daß bei beiden Kühen ein deutlicher Anstieg des Progesterongehaltes vom Anfangsgemelk zum Endgemelk hin zu beobachten war. Er war bei der Kuh "Olga" um den Faktor 3, bei der Kuh "Rondo" um den Faktor 5 angestiegen.

Zur Ergänzung dieser Untersuchungen wurden bei zwei weiteren Kühen (Kuh "Kakdi" und Kuh "Kaffeil") während der Gelbkörperphase des Zyklus Milchproben, die zu Beginn, in der Mitte und am Ende des Melkvorganges sowie aus dem Gesamtgemelk entnommen wurden, auf ihre Progesteron- und Fettkonzentration untersucht. Dabei bestätigte sich, wie aus der Abbildung 24 hervorgeht, daß die absoluten Progesteronkonzentrationen direkt abhängig vom Fettgehalt der Milch sind.

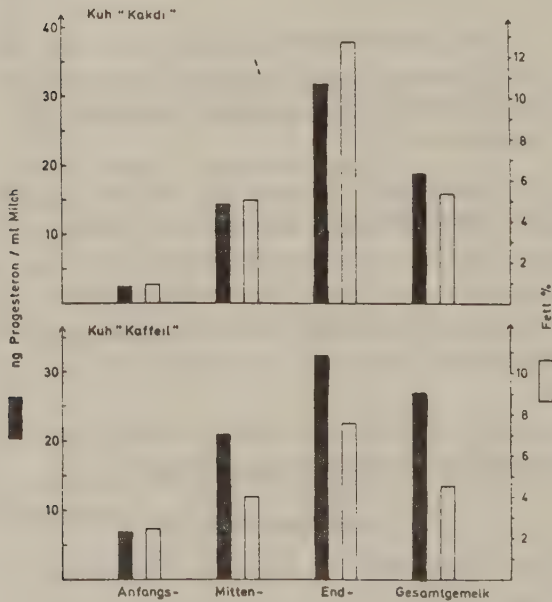


Abb. 24 Veränderungen der Progesteron- und Fettkonzentration in der Milch während eines Melkvorganges

4.3.2. Beziehungen zwischen Progesteronkonzentrationen und Fettgehalten in Milchproben während Zyklus und Frühträchtigkeit

Aufgrund der in Kapitel 4.3.1. dargelegten Versuchsergebnisse ist es wahrscheinlich, daß die - im Gegensatz zu Plasma - in der Milch gemessenen Schwankungen der Progesteronkonzentrationen von Tag zu Tag mit Schwankungen im Fettgehalt der jeweiligen Milchprobe in Zusammenhang zu bringen sind.

Um dies zu überprüfen wurden bei drei Kühen, bei denen während des Zyklus und der Frühträchtigkeit die Progesteronkonzentrationen in Plasma und Milch bereits bestimmt worden waren, noch zusätzlich der Fettgehalt in den Milchproben bestimmt.

Es sollte eine Kuh, die im Nachgemelk einen relativ niedrigen und eine Kuh, deren Nachgemelk einen relativ hohen Fettgehalt aufwies, ausgewählt werden; nach stichprobenartiger Untersuchung wurden hierfür die von den Kühen "Rowido" und "Rolino" gesammelten Milchproben verwendet. Im Vergleich dazu sollten noch die Proben aus dem Gesamtgemelk der Kuh "Anni" gemessen werden.

Bei diesen drei Tieren wurde dann der in der Milch gemessene Progesterongehalt in Bezug zum prozentualen Fettgehalt gesetzt. Der so errechnete Wert wurde noch mit einem Vergrößerungsfaktor (v) multipliziert, um für die graphische Darstellung der auf diese Weise errechneten "Progesteron - Relativwerte" die gleiche Skala wie für die Absolutwerte von Progesteron in Plasma und Milch verwenden zu können. (Zur Darstellung der Progesteron - Relativwerte wurde bei der Kuh "Rowido" der Faktor $v = 3$, bei der Kuh "Rolino" der Faktor $v = 5$ und bei der Kuh "Anni" der Faktor $v = 2$ verwendet.)

Zur Errechnung der Progesteron - Relativwerte gilt die folgende Formel:

$$\frac{\text{ng Prog} - \text{Rel}}{\text{ml}} = \frac{\text{ng Prog} / \text{ml Milch}}{\text{Fettgehalt in \%}} \times v$$

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in den Abbildungen 25, 26 und 27 dargestellt (s. auch Tabellenanhang Tab. 21, 24 und 27).

Einheitlich sind in diesen Abbildungen in einem eigenen Koordinatensystem die Fettkonzentration (% Fett) sowie in einem zweiten Koordinatensystem die Absolutwerte für Progesteron in Milch und Plasma sowie die Progesteron - Relativwerte dargestellt.

Deutlich zeigen sich in den drei Abbildungen Schwankungen in der MilCHFettkonzentration von Tag zu Tag; vielfach gehen diese Schwankungen in der Progesteronkonzentration in der Milch mit den Schwankungen im MilCHFettgehalt einher. Z.B. zeigt sich bei der Kuh "Rowido" ein sehr deutlicher Anstieg sowohl der Fett- als auch der Progesteronkonzentration vom Tag 9 auf den Tag 11 während der Frühgravidität, entsprechend bei der Kuh "Rolino" von Tag 17 auf Tag 19 der Frühgravidität sowie bei der Kuh "Anni" von Tag 17 auf Tag 19 des Zyklus.

Die Abbildungen zeigen auch, daß die Progesteron-Relativwerte für Milch ähnlich wie die Progesteron-Plasmawerte gleichmäßiger verlaufende Kurven während des Zyklus und der Frühgravidität geben als die Progesteron-Absolutwerte in der Milch. Dieser Effekt ist am deutlichsten bei der Kuh "Rolino" während der Frühgravidität ausgeprägt und zeigt sich am wenigsten bei der Kuh "Anni".

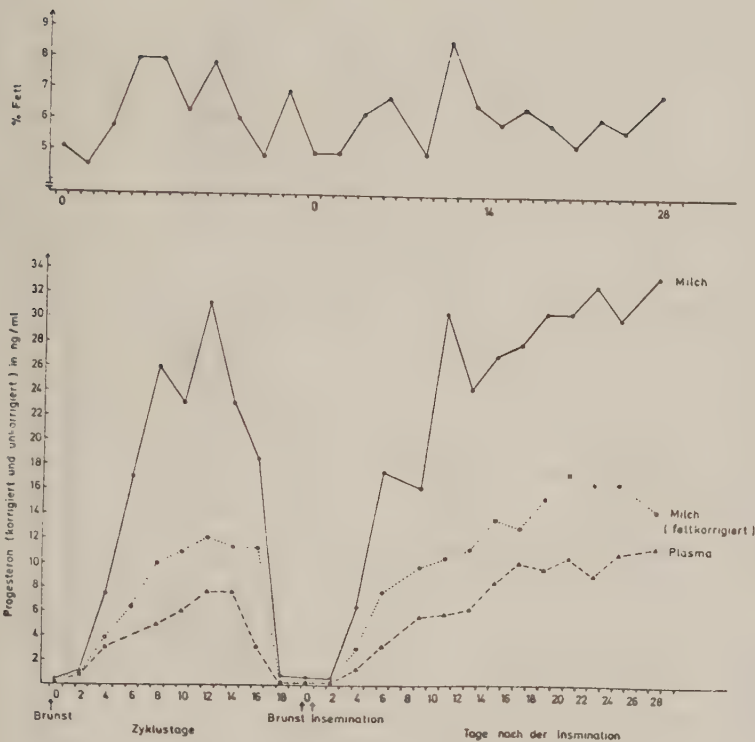


Abb. 25 Kuh "Rowido": Progesteronkonzentrationen im Plasma, Progesteronkonzentrationen und Fettgehalt im Nachgemelk und Progesteron - Relativwerte im Nachgemelk während des Zyklus und der Frühgravidität

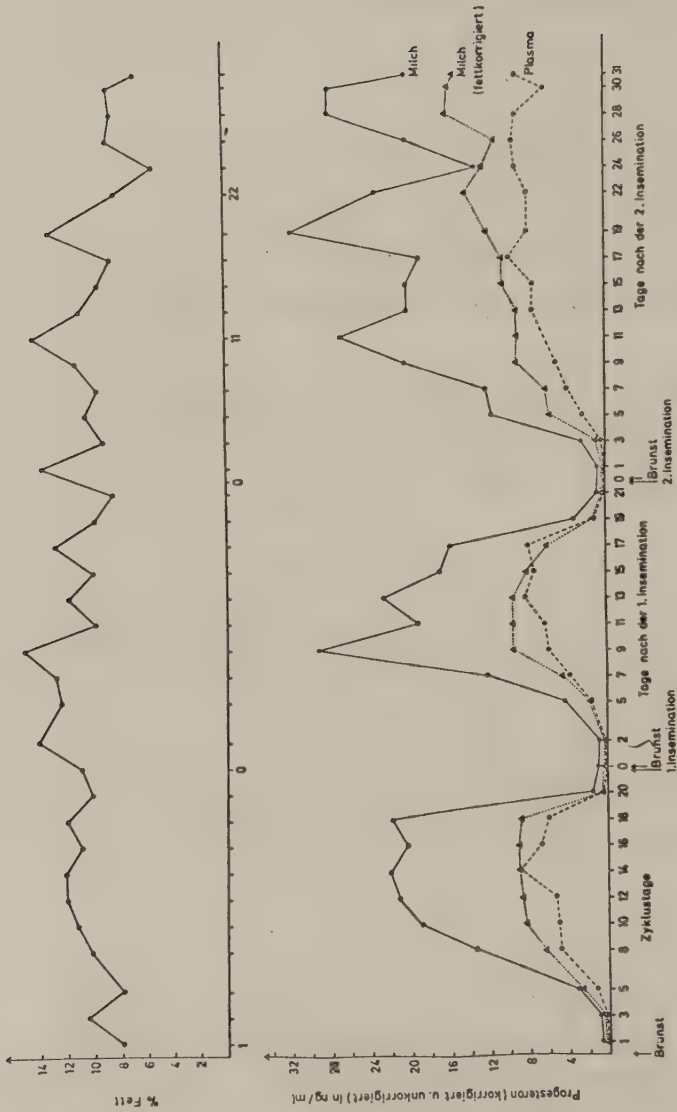


Abb. 26 Kuh "Rolino": Progesteronkonzentrationen im Plasma, Progesteronkonzentrationen und Fettgehalt im Nachgemelk und Progesteron-Relativwerte im Nachgemelk während zweier Zyklen und der anschließenden Frühgravidität

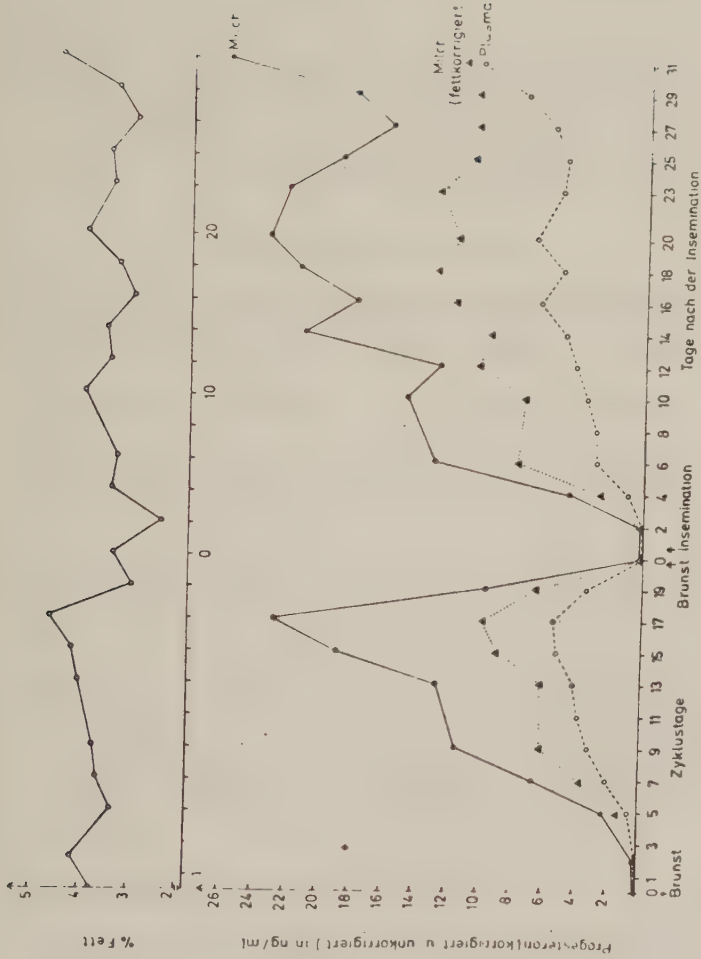


Abb. 27 Kuh "Anni": Progesteronkonzentrationen im Plasma, Progesteronkonzentrationen und Fettgehalt im Gesamtmelk und Progesteron-Relativwerte im Gesamtmelk während eines Zyklus und der anschließenden Frühgravidität

Dieser sehr subjektive Eindruck hat sich durch Vergleich der Korrelationskoeffizienten bestätigt, wie auch aus Tabelle 14 hervorgeht.

Tab. 14

Korrelationskoeffizienten (r) für: Absolutwerte von Progesteron in Plasma und Milch, bzw. Absolutwerte von Progesteron in Plasma und Relativwerte von Progesteron in der Milch während Zyklus und Frühgravidität.

Kuh	Korrelationskoeffizient (r)			
	Plasma : Milch-absolut		Plasma : Milch-relativ	
	Zyklus	Frühgravidität	Zyklus	Frühgravidität
"Rowido"	0,91	0,93	0,95	0,96
"Rolino"	0,91	0,70	0,93	0,88
"Anni"	0,99	0,93	0,99	0,95

So ergab sich zum Beispiel bei der Kuh "Rolino" eine Verbesserung des Korrelationskoeffizienten von 0,70 auf 0,88 in der Frühgravidität bei Bezugnahme auf die Progesteron - Relativwerte der Milch; bei diesem Tier wurde, wie oben erwähnt, das Nachgemelk untersucht. Am geringsten war der Effekt der "Fettkorrektur" bei der Kuh "Anni", bei der das Progesteron im Gesamtgemelk untersucht worden war.

Im Hinblick auf diese Feststellung wurden die Milchproben der Kuh "Nelly" (s. Kap. 4.2.) noch nachträglich auf ihren Fettgehalt überprüft. Wie auf S. 90 beschrieben ist, fiel bei dieser Kuh die Progesteronkonzentration in der Milch ab dem 12. Tag nach der Insemination um ca. 65 % ab und erreichte erst am 26. Tag nach der Besamung wieder den Ausgangswert. Es zeigte sich, daß der Abfall mit einer

starken Abnahme der Fettkonzentration in den Milchproben einherging. Wie aus der Tabelle 31 deutlich zu ersehen ist, sank parallel zum Progesteronabfall (22,0 ng Progesteron / ml Nachgemelk am Tag 12, 8,0 ng Progesteron pro ml Nachgemelk am Tag 17) der Fettgehalt der Proben von 9,5 % auf 1,5 %. Am 26. Tag nach der Besamung wurde wieder eine angestiegene Progesteronkonzentration von 30,5 ng Progesteron / ml Nachgemelk gemessen, bei einem Fettgehalt der Milchprobe von wiederum 9,3 %.

4.3.3. Verlauf der Progesteronkonzentration im Milchfett einer Kuh während eines Zyklus

Nachdem die starke Affinität von Progesteron zum Milchfett durch die unter Kapitel 4.3.1. und 4.3.2. erarbeiteten Ergebnisse eindeutig nachgewiesen worden war, erschien es möglich, eine Progesteronbestimmung statt in der Milch direkt im Milchfett durchzuführen. Zumindest theoretisch ergäben sich dadurch vom Probenmaterial her den im Kap. 4.3.2. errechneten Relativwerten entsprechende Meßwerte.

Um dies zu überprüfen, wurden 14 Milchproben der Kuh "Kalma", die während eines Zyklus entnommen worden waren, bei 4°C und 10 000 rpm 15 Minuten lang zentrifugiert. Vom überstehenden Milchfett wurden von jeder Milchprobe im Doppelansatz 10 mg eingewogen. Anschließend wurde mit der für Milch erarbeiteten Bestimmungsmethode (s.S.43) die Progesteronbestimmung durchgeführt.

Die Abbildung 28 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung: Bereits aus der graphischen Darstellung der Progesteronkonzentrationen im Plasma, die bereits früher gemessen wurden (s.Kap. 4.1.), und Milchfett sind die engen Beziehungen beider Datenreihen ersichtlich; die von den Ergebnissen der Milchuntersuchung her bekannten starken Schwankungen im Bereich höherer Progesteronkonzentrationen sind ausgeblieben.

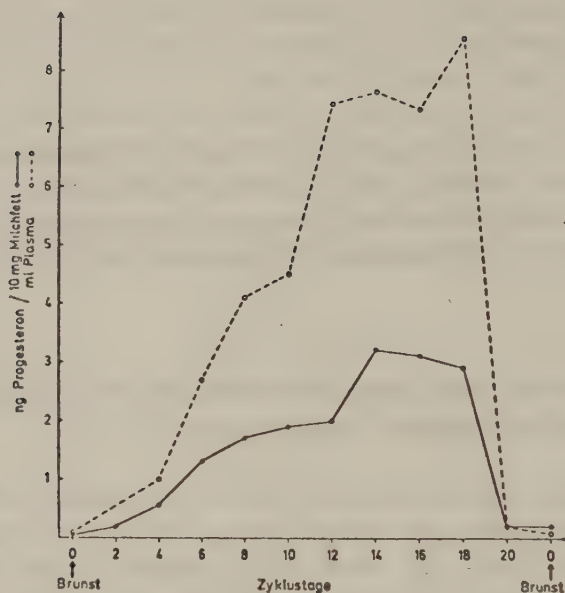


Abb. 28 Progesteronkonzentrationen in Plasma und Milchfett der Kuh "Kalma" während eines Zyklus

Die Progesteronkonzentrationen im Milchfett steigen von 0,2 ng / 10 mg in der Brunst auf einen Höchstwert von 3,1 ng / 10 mg während der Gelbkörperphase, das entspricht einem Gehalt von 310 ng Progesteron pro g Milchfett.

Eine Berechnung des Korrelationskoeffizienten bei Vergleich des Verlaufs der Progesteronkonzentrationen in Plasma und Milchfett ergab einen Wert von $r = 0,97$.

4.4. Bestimmung der Progesteronausscheidung über die Milch bei Kühen mit unterschiedlicher Milchleistung.

Bei diesem Versuch wurde geprüft, ob ein Unterschied in der Progesteronausscheidung und der Progesteronkonzentration in der Milch bei Kühen mit unterschiedlicher Milchleistung besteht.

Hierzu wurde bei zwei Kühen, die ungefähr gleich lange trächtig waren (ca. 4 1/2 Monate), aber stark unterschiedliche Milchleistungen aufwiesen, die Progesteronausscheidung mit der Milch über einen Zeitraum von zwei Tagen gemessen. Aus den pro Kuh anfallenden 4 Gesamtgemelken wurden Milchproben entnommen und die Progesteronbestimmung durchgeführt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Tabelle 15 zusammengestellt.

Tab. 15 Progesteronkonzentration und -ausscheidung in der Milch zweier Kühe mit unterschiedlicher Milchleistung

Kuh	Milchmenge (l) in zwei Tagen (4 Gemelke)	Durchschnittliche Progesteronkonzentration (ng / ml)	Progesteron- ausscheidung in 2 Tagen (mg)
"Zenzi"	18,3	20,2	0,35
"Rondo"	40,8	20,7	0,84

Es ist zu ersehen, daß die Progesteronkonzentration in der Milch bei beiden Kühen bei ca. 20 ng pro ml liegt. Aufgrund der doppelten Milchleistung der Kuh "Rondo" scheidet diese aber auch ca. die doppelte Menge an Progesteron über die Milch aus.

4.5. Bestimmung von Progesteron in Einzelgemelken zum Nachweis der Frühgravidität

Im Rahmen der sog. Phase 3 des Versuchsplanes wurden in Zusammenarbeit mit dem Tiergesundheitsdienst Bayern e.V.^x von Kühen am 20.Tag nach der Insemination oder Belegung direkt vom Tierhalter Einzelgemelksproben entnommen und zur Bestimmung von Progesteron im Hinblick auf eine Frühträchtigkeitsdiagnose an unser Labor abgeschickt. Die Proben wurden nur entnommen, wenn die Kuh zum Entnahmezeitpunkt keine Brunstsymptome zeigte; der Tag 20 nach der Insemination (Tag der Insemination = Tag 1) wurde als Probennahmetag gewählt, da nach unserer Erfahrung (s.Kap. 4.1.) zu diesem Zeitpunkt die größte Wahrscheinlichkeit besteht, bei nicht eingetretener Konzeption in die Follikelphase des Zyklus und somit in den Zeitraum niederer Progesteronkonzentrationen in der Milch zu kommen.

Von uns vorbereitete Gläser (s.Kap. 3.3.1.) wurden von Mitarbeitern des Rindergesundheitsdienstes an die Tierbesitzer verteilt. Beigelegt wurde eine voradressierte Kartonage und ein Schriftstück, das als Anweisung für den Tierbesitzer, als Begleitbericht für die mit der Post versandte Probe und zur Eintragung der Ergebnisse der Progesteronbestimmung in der Milch und der rektalen Trächtigkeitskontrolle durch Tierärzte des Rindergesundheitsdienstes zu einem späteren Zeitpunkt diente (s.Abb. 28). Von den bisher eingetroffenen und untersuchten 55 Proben waren 52 aus dem Nachgemelk entnommen, bei drei Proben fehlten diesbezügliche Angaben. Die Entnahme der Probe kann sowohl aus dem Nachgemelk als auch aus dem Gesamtgemelk geschehen, aber wie zu sehen war, hat die Entnahme aus dem Nachgemelk - man denke an den Einsatz von Milchabsaugleitungen in größeren Kuhhaltungen - bedeutend technische Vorteile.

x) An dieser Stelle sei Herrn Dr. Günzler vom TGD Bayern e.V. für seine Mitarbeit im Rahmen dieses Feldversuches herzlich gedankt.

In der Abbildung 29 ist ein im Rahmen dieser Versuche verwendetes Begleitschreiben, teilweise bereits mit Eintragungen versehen, abgebildet.

ZUR BEACHTUNG!

Die Milch für den Trächtigkeitstest ist am 20. Tag nach der letzten Belegung zu entnehmen, wobei der Tag der Belegung als 1. Tag zu zählen ist.
Die Milch kann aus dem Gesamtgemelk der Kuh, oder aus dem Nachgemelk (nicht aus dem Vorgemelk) genommen werden, doch ist dies jeweils im Begleitbericht anzugeben.
Nach Einfüllen der Milch in das Proberöhrchen ist dieses fest zu verschließen und die Probe im voradressierten Karton baldmöglichst zu versenden.

Begleitbericht zur Milcheinsendung auf Trächtigkeit

Bestand... *Hester, Maria, Buhlhausen, 8.7.1.46.*
Kuh, (Name, OM, Nr.) *Salma 0504388* Zahl d. Kälber...
Letztmals belegt am *30. 12.*... KB, Natursprung^x
Milchprobe entnommen am *22. 1. 46* Gesamtgemelk, Nachgemelk^x

Ergebnis d. Inst. f. Physiologie Weihenstephan

19,0 ng Progesteron pro ml Milch : Trächtig

Ergebnis der rekt. Untersuchung am:.....

Bei abweichender Diagnose z. Milchergebnis
Eierstockbefund.....

.....

unters. Tierarzt

Tiergesundheitsdienst
Bayern e.V.

TGL-~~Lehrstuhl~~
87 Würzburg, Sternstraße 9

x) zutreffendes unterstreichen

Abb. 29 Begleitschreiben zu Einzelgemelksproben, die zum Zwecke der Progesteronbestimmung verschickt werden

Als Ergebnis der Progesteronbestimmung in der Milch wurden 9 der 55 Tiere als nicht trächtig eingestuft, obwohl sie am Tag der Probennahme keine Brunstsymptome zeigten. Die Konzentrationen schwankten zwischen 0,75 und 3,25 ng Progesteron pro ml Milch.

Bei 40 Proben differierten die Progesteronkonzentrationen in der Milch zwischen 13,0 und 32,0 ng / ml. Diese Tiere wurden als trächtig eingestuft.

Bei zwei Tieren wurde trotz der Angabe Nach- oder Gesamtgemelk offensichtlich fast fettfreies Anfangsgemelk entnommen; die Progesteronbestimmung ergab Konzentrationen von 6,0 bzw. 7,5 ng Progesteron / ml Milch. Diese Konzentration erschien bei dem niedrigen Fettgehalt als hoch genug, um diese Tiere ebenfalls als trächtig einstufen zu können.

Lediglich bei einer Probe konnte mit 7,1 ng Progesteron pro ml Nachgemelk keine eindeutige Aussage hinsichtlich einer eingetretenen Konzeption gemacht werden.

Bis zum 14.1.74 wurden 23 Kühe, von denen Milchproben eingesandt wurden, von Tierärzten des Rindergesundheitsdienstes auf Trächtigkeit nachuntersucht.

In 22 Fällen stimmte die gestellte Diagnose aufgrund der Progesteronbestimmung in der Milch mit der Diagnose durch rektale Untersuchung auf Trächtigkeit zu einem späteren Zeitpunkt überein.

In einem Fall wurde eine Kuh (OM 16 43 84 7) mit 19,0 ng Progesteron pro ml Milch am 20. Tag nach der Belegung als trächtig befunden. Sonderbarerweise hat das Tier 30 Tage nach der Belegung wieder gerindert. Diese Feststellungen können zwei Erklärungen haben: Entweder stand das Tier zum Zeitpunkt der ersten Belegung und somit auch zur Zeit der Milchprobenentnahme nicht in der Follikelphase des Ovars oder es ist bei eingetretener Konzeption ein Frühabort eingetreten, worauf die Kuh am 30. Tag nach der Belegung wieder gerindert hat.

4.6. Progesterongehalte in handelsüblichen Milchprodukten

Aufgrund der außerordentlichen Bedeutung von Milch und Milchprodukten in der Ernährung des Menschen und im Hinblick auf die intensive Forschung auf dem Gebiet der Hormonrückstandsbestimmung in Lebensmitteln tierischer Herkunft erschien es interessant, handelsübliche Milchprodukte auf ihren Progesterongehalt zu untersuchen. Das Ergebnis dieser Versuche ist in der Tabelle 16 zusammengestellt.

Wie zu erwarten war (s.Kap. 4.3.) richten sich die Progesteronkonzentrationen in den verschiedenen Milchprodukten nach dem jeweiligen Fettgehalt.

So wurde in der Magermilch mit ca. 0,1 % Fett eine Progesteronkonzentration von 1,4 ng / ml Milch gemessen, während in der Butter mit über 80 % Fettanteilen ein Wert von ca. 300 ng Progesteron / g ermittelt wurde.

Interessant erscheint die Tatsache, daß verschiedene Bearbeitungs- und Haltbarmachungsverfahren den Progesterongehalt der Milchprodukte nicht zu beeinflussen scheinen. Einbußen in dieser Hinsicht sind nur in geringerem Maße bei einem durch einen bakteriellen Vorgang gesäuerten Produkt (Schwedenmilch, pasteurisiert und gesäuert) und in stärkerem Maße bei ungezuckerter Kondensmilch (Bärenmarke) mit einem relativ hohen Fettgehalt von 10 % zu verzeichnen gewesen.

Tab. 16 Progesteronkonzentrationen in verschiedenen handelsüblichen Milchprodukten

Milchprodukt	Fettgehalt %	Progesteron ng/ml (g)
Trinkmilch	3,5	12,50
Magermilch	ca. 0,1	1,40
Rahm	ca. 32,0	43,00
Buttermilch	ca. 1,0	6,50
"Neuburger Vollmilch"	3,5	11,75
H-Milch	1,5	6,00
"Schwedenmilch"	1,5	4,20
"Bärenmarke"	10,0	12,25
Markenbutter	mind. 80,0	300,00

5. DISKUSSION

5.1. zur Methode

Ausgehend von den guten Erfahrungen bei der radioimmunologischen Bestimmung von Progesteron im Plasma wurde für die vorliegenden Untersuchungen über das Vorkommen von Progesteron in der Milch von Anfang an ein radioimmunologisches Verfahren eingesetzt. Im Gegensatz zu Blutplasma, wo eine einfache Extraktion mit Petroläther genügt, mußte für die Progesteronbestimmung in der Milch ein aufwendigerer Extraktionsgang entwickelt werden. Trotzdem kann die Praktikabilität des Verfahrens als gut bezeichnet werden und von einem rationellen Arbeitsgang gesprochen werden, da von einer Person in 120 Einzelproben Progesteron innerhalb von zwei Tagen bestimmt werden kann (bei Zugrundelegung der derzeitigen Ausstattung des hiesigen Labors).

Die Bewältigung dieser Probenzahl wird ermöglicht durch den Einsatz des bis zu 120 Proben fassenden Schüttelautomaten (s.S. 27) und der Verwendung automatischer Pipettiereinrichtungen sowie von Einweg - Glaswaren. Durch weitere Verbesserungen der Automatisierung würde es sicherlich gelingen, die Kapazität noch zu erhöhen (Vergrößerung der Zentrifugenkapazität, Computer-Auswertung des Radioimmunotests).

Sicherlich wird es jedoch nur unter Einbuße an Aussagekraft des Verfahrens hinsichtlich einer eingetretenen oder nicht eingetretenen Konzeption möglich sein, den Zeitaufwand für die Progesteronbestimmung in einer Einzelprobe zu reduzieren. Für eine diesbezüglich positive Aussage fallen nämlich dann die gemessenen Progesteronkonzentrationen in den Bereich ab, in dem ein klares Urteil nicht mehr abgegeben werden kann. Versuche in dieser

Richtung (s.Kap. 3.3.2.), wobei insbesondere das Ausfrieren über Nacht in Methanol gekürzt werden sollte, haben dies bestätigt.

Im Kapitel 3.2.4. konnte gezeigt werden, daß das beschriebene Verfahren allen an die Zuverlässigkeit der Methode gestellten Ansprüchen gerecht wurde.

Die aufgrund der Bindungseigenschaften des Antiserums (s.Abb. 7,8) erwartete hohe Spezifität der Methodik konnte in einem speziellen Versuch bestätigt werden, in dem Progesteron in Milch und Plasma vor und nach Entfernung des Corpus luteum gemessen wurde (s.S. 54). Herauszuheben ist auch, daß trotz der sehr hohen Empfindlichkeit (untere Empfindlichkeitsgrenze ca. 0,06 ng) die Genauigkeit der Methode sowohl in den niedrigen als auch in den hohen Konzentrationsbereichen als sehr gut bezeichnet werden muß, wie aus den Tabellen 7 und 8 hervorgeht. Auch bei Überprüfung der Reproduzierbarkeit durch wiederholte Untersuchungen ein und derselben Milchprobe während eines längeren Zeitraums erbrachte die Methode sehr gute Ergebnisse.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es gelang, eine zuverlässige und hochempfindliche Methode zu entwickeln, die es bei einem relativ geringen Arbeitsaufwand erlaubt, noch im unteren Nanogramm-Bereich Progesteron in der Milch genau zu messen.

5.2. zu den physiologischen Ergebnissen und der praktischen Anwendung

Aus vorliegenden Untersuchungen ergibt sich in klarer Weise ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Gelbkörperfunktion und dem Verlauf der Progesteronkonzentrationen in der Milch vom Rind. So sanken im Anschluß an eine Eukleation die Progesteronwerte nicht nur im Blutplasma sondern auch in der Milch auf Konzentrationen unter 0,5 ng / ml. Auf die sich daraus ergebende Tatsache, daß das in der Milch vorkommende Progesteron fast ausschließ-

lich vom Gelbkörper zu stammen scheint, wurde oben schon hingewiesen. Für diese Tatsache spricht auch die Beobachtung, daß allgemein zum Zeitpunkt der Brunst im Blutplasma und in der Milch gleich niedrige Progesteronwerte zwischen 0,1 und 0,8 ng Progesteron / ml gemessen werden.

Damit wird eine ähnliche Beobachtung von Heap et al. (1973) bestätigt, die ebenfalls auf den Zusammenhang zwischen der Gestagenkonzentration in der Milch und der Ovarfunktion hinweisen. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen wird von diesen Autoren zunächst nicht von Progesteron, sondern ganz allgemein von Progestagen gesprochen (unter Progestagenen sind Substanzen mit gestagener Wirkung zu verstehen, z.B. 17a OH-Progesteron, die ähnlich wie Progesteron mit Transcortin eine Bindung eingehen).

Aufgrund der eigenen Untersuchungen muß angenommen werden, daß das Progesteron durch einfache Diffusion vom Blut in die Milch gelangt, wie sich insbesondere durch die Ergebnisse des Eukleationsversuches sowie aus den gleich niedrigen Progesteronwerten in Plasma und Milch während der follikulären Phase ergibt. Eine signifikante Eigensynthese von Progesteron im Eutergewebe, wie sie von Heap et al. (1973) diskutiert wird, scheint also nach den eigenen Ergebnissen unwahrscheinlich zu sein. Möglicherweise ist diese Diskrepanz in der Aussage jedoch auf Unterschiede in der Spezifität der angewandten Methodik zurückzuführen. So wurden zum Beispiel während der follikulären Phase von Heap et al. (1973) deutlich höhere Progesteronwerte gemessen (um 1,0 ng Progesteron / ml Milch) als in den eigenen Untersuchungen.

Die Funktion des Gelbkörpers scheint also der primäre Faktor zu sein, von dem das Vorkommen von Progesteron in der Milch abhängig ist. Als zweiter und nachgeordneter Faktor jedoch, der stichprobenabhängig die Höhe der Progesteronkonzentration beeinflussen kann, muß aufgrund der vorliegenden Untersuchungen die Höhe der Milchfettkonzentration angesehen werden. So konnte gezeigt werden,

daß - vorausgesetzt ein funktionsfähiges Corpus luteum ist vorhanden - parallel zum Anstieg des MilCHFettes während des Melkvorganges (Johannson et al. 1952) auch die Progesteronkonzentration steigt (s.Kap. 4.3.1.).

Die sich auch in diesem Vorgang aufzeigenden lipophilen Eigenschaften von Progesteron erklären, warum besonders bei Milchproben mit hohem Fettgehalt die in der Milch gemessenen Progesteronkonzentrationen um den Faktor 2-3 höher liegen können als die im Blutplasma gemessenen. Demnach muß angenommen werden, daß bei der Kuh über das Euter relativ hohe Progesteronmengen ausgeschieden werden.

Untersuchungen bei einer Kuh mit vergleichsweise hoher Milchleistung ergaben nach unseren Berechnungen eine mehr als doppelt so hohe Ausscheidung an Progesteron über das Euter als bei einer Kuh, die in der Milchleistung um die Hälfte niedriger lag (s.auch Kap. 4.4.).

Diese Tatsache bestärkt die Vermutung von Günzler (1973 pers. Mitteilung), wonach bei Kühen mit hoher Milchleistung ein Defizit im Progesteronhaushalt durch die Progesteronausscheidung mit der Milch entstehen könnte, das für Fertilitätsstörungen eventuell verantwortlich gemacht werden kann. Im Vergleich zur Sekretionsrate des Gelbkörpers liegt die Progesteronausscheidung über das Euter nach überschlägigen Berechnungen allerdings unter 2 %.

Auf den Zusammenhang zwischen der Progesteronkonzentration im Blut und der Möglichkeit zur Diagnose einer Frühträchtigkeit beim Rind zwischen den Tagen 19 bis etwa 23 nach der Besamung haben erstmals Shemesh et al. (1968) hingewiesen. Die mögliche Bedeutung einer solchen Frühdiagnose für die Praxis konnte 1971 von Hoffmann in einem Fall aufgezeigt werden, bei dem durch eine Zweitbesamung 27 Tage nach der Erstbesamung ein Frühabort ausgelöst wurde.

Statt Blutplasma bietet sich nun Milch als Substrat zur Progesteronbestimmung in Hinblick auf die Frühdiagnose einer Trächtigkeit an, wobei ebenfalls die Untersuchung an den Tagen 19 bis 23 nach der Insemination erfolgen sollte. Bei den in den eigenen Versuchen verwendeten Tieren ergab eine Berechnung des Mittelwertes der Progesteronkonzentration im Nachgemelk bei eingetretener Gravidität an den Tagen 19 bis 23 nach der Besamung 22,3 ng Progesteron pro ml; der entsprechende Wert für Gesamtgemelk (allerdings nur eine Kuh) lag bei 12,3 ng Progesteron pro ml.

Die auf diesen Erkenntnissen aufbauende Theorie einer Frühträchtigkeitsfeststellung über die Progesteronbestimmung in der Milch lautet folgendermaßen:

Ist bei einer Kuh nach der Samenübertragung keine Konzeption eingetreten, so erreicht sie mit hoher Wahrscheinlichkeit am 20. Tag danach wieder das follikuläre Stadium des Ovars, d.h. in der Milch werden sehr niedrige Progesteronkonzentrationen gemessen. Ist jedoch eine Konzeption eingetreten, so bildet sich das Corpus luteum periodicum nicht zurück, sondern bleibt als Corpus luteum graviditatis erhalten; d.h. am 20. Tag nach der Insemination werden auf jeden Fall hohe Progesteronkonzentrationen in der Milch gemessen.

Bei diesen Versuchen sind von der chemisch analytischen Seite her keine Schwierigkeiten zu erwarten, da insbesondere auch das Problem der Probenkonservierung (Verschicken der Milchproben mit der Post) gelöst wurde (s. Kap. 3.3.1.). Voraussetzung für den Erfolg des Verfahrens ist jedoch vielmehr eine gewissenhafte Buchführung und Probennahme des Tierbesitzers.

Grundsätzliche Schwierigkeiten können bei Tieren auftreten, deren Zyklus extrem stark verlängert oder verkürzt ist, sodaß bei nicht eingetretener Konzeption der Tag 20 nach der Insemination noch in die Gelbkörperphase des alten oder bereits in die des neuen Zyklus fällt. (Nach vor-

sichtiger Schätzung aufgrund der bisherigen Untersuchungen am hiesigen Institut dürfte aber diese Zahl erheblich unter 5 % liegen.) Bis jetzt haben unsere eigenen Befunde prinzipiell die Praktikabilität eines solchen Verfahrens des Trächtigkeitsnachweises über die Progesteronbestimmung in der Milch bestätigt.

Nach Aussagen von Heap et al. (1973) liegt eine Trächtigkeit beim Rind vor, wenn an den Tagen 20 bis 28 nach der Insemination Progesteronkonzentrationen zwischen 7 und 8 ng / ml Milch gemessen werden, wobei zur Absicherung der Diagnose eine mehrmalige Progesteronbestimmung in diesem Zeitraum gefordert wird. Damit ergeben sich im Vergleich zu den eigenen Untersuchungen grundsätzliche Unterschiede, nach denen vorgeschlagen wird, den Trächtigkeitsnachweis durch die gezielte einmalige Bestimmung von Progesteron in der Milch am 20. Tag nach der Insemination zu erbringen; hierbei kann nur bei Anwesenheit eines voll funktionsfähigen Corpus luteum auf eine Trächtigkeit geschlossen werden.

Die von Heap et al. (1973) bei eingetretener Frühträchtigkeit gemessenen Progesteronkonzentrationen um 7-8 ng pro ml Milch während der Tage 20 bis 28 nach der Besamung und um 3 ng pro ml Milch bei nicht eingetretener Gravidität lassen den Schluß zu, daß ein Unterschied in der Progesteronproduktion im Gelbkörper bei trächtigen und nicht trächtigen Tieren besteht. Nach den eigenen Untersuchungen kann ja am 28. Tag nach der Insemination auch bei nicht eingetretener Gravidität bereits wieder mit einem voll funktionsfähigen Gelbkörper gerechnet werden, wobei sich mit Durchschnittswerten von mehr als 12 ng Progesteron pro ml Gesamtmelk (im Nachgemelk von mehr als 20 ng / ml) von der Progesteronproduktion her kein Unterschied zwischen einem Corpus luteum periodicum und einem Corpus luteum graviditatis feststellen läßt.

Eindeutig liegen in den eigenen Untersuchungen in der Follikelphase um den Ovulationszeitpunkt, bei nicht eingetretener Gravidität also auch am Tag 20 nach der In-

semination, die Progesteronkonzentrationen unter 1 ng pro ml Milch. Gelegentlich geringgradig höher liegende Werte sprechen dafür, daß bei Tieren mit etwas kürzerem oder längerem Zyklus die Probennahme in die Regressionsphase oder Anbildungsphase des Corpus luteum fiel; in jedem Fall ist dies ein Zeichen für eine nicht eingetretene Gravidität.

Sicherlich sind diese festgestellten quantitativen Unterschiede methodenbedingt. So konnte ja gerade in vorliegender Arbeit gezeigt werden, daß erst bei Anwendung eines speziell entwickelten Extraktionsganges spezifische Meßwerte erhalten wurden.

Für die praktische Anwendung der Progesteronbestimmung in der Milch sollte zur Schaffung einer einheitlichen Ausgangsbasis zunächst der Faktor "Milchfett" berücksichtigt werden. Als optimal wäre hier selbstverständlich eine Bestimmung des Fettgehaltes in jeder Milchprobe anzusehen, um darauf die Progesteronkonzentration zu beziehen. Als für die Praxis geeigneter Ersatz dafür bietet sich jedoch an, Progesteron konstant im Nachgemelk oder besser noch im Gesamtgemelk zu bestimmen.

Wie bereits in Kapitel 4.5. erwähnt, wurde in Zusammenarbeit mit dem Tiergesundheitsdienst Bayern E.V. ein erster Feldversuch gestartet inwieweit durch eine Progesteronbestimmung in Nach- oder Gesamtgemelken, die am 20. Tag nach der Insemination bzw. Belegung entnommen wurden, eine praktikable Aussage auf "trächtig" oder "nicht trächtig" gemacht werden kann.

Diese Festlegung wurde bewußt getroffen, obwohl durch die Progesteronbestimmung in der Milch nur über das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines Gelbkörpers eine Aussage gemacht werden kann; eine Unterscheidung zwischen Corpus luteum periodicum und Corpus luteum graviditatis allein anhand der Progesteronkonzentrationen in der Milch ist nach den von uns erarbeiteten Ergebnissen nicht

möglich.

Das bisherige Ergebnis dieses Versuches wurde in Kapitel 4.5. zusammengefaßt. Dabei ergab sich bei 22 von 23 Tieren eine Übereinstimmung der klinischen Diagnose seitens des Tiergesundheitsdienstes mit der schon vorher aufgrund der Progesteronbestimmung im Labor gestellten Diagnose "trächtig" oder "nicht trächtig".

Über in dieser Richtung weiter durchgeführte Untersuchungen hat Günzler (1974) vorläufig berichtet. Bedeutungsvoll erscheint hier die Tatsache, daß in allen Fällen einer negativen Aussage ("nicht trächtig") der Laborbefund mit dem der tierärztlichen Trächtigkeitskontrolle übereinstimmte. In den positiven Fällen ("trächtig") konnte diese Übereinstimmung nur bei 85 % der Tiere erzielt werden, da klinische Störungen der ovariellen Vorgänge (z.B. Corpus luteum - Zysten) eine in jedem Fall zuverlässige Diagnose nicht ermöglichen.

5.3. zur Bestimmung der Progesteronkonzentrationen in Milch und Milchprodukten als Lebensmittel

Die Ergebnisse der Progesteronbestimmung in Milch und Milchprodukten haben gezeigt, daß - je nach deren Fettgehalt - 1,4 ng Progesteron pro ml Magermilch bis zu Größenordnungen von 300 ng Progesteron pro g Butter enthalten sein können. Diese Konzentrationen berechtigen dazu, kurz zum Problem der Rückstände von Hormonen in Lebensmitteln tierischer Herkunft Stellung zu nehmen.

Milch und Milchprodukte gehören in großem Umfang zu den Nahrungsmitteln des Menschen. Schäden, die auf die Progesteronkonzentration in der Milch zurückzuführen sind, wurden nicht beobachtet. Diese Tatsache sollte zu denken geben und dazu führen, von der in der Öffentlichkeit, insbesondere in der Presse häufig sichtbar gewordenen, übertriebenen Angst vor Hormonen in Nahrungsmitteln wegzufinden und - speziell für wissenschaftliche

Zwecke - eine neue Diskussionsgrundlage zu schaffen.

Die mit einem Gramm Butter aufgenommene Menge von 0,3 µg Progesteron ist als verschwindend gering zu bezeichnen und es kann ihr auch keine beweisbare orale Wirkung zugeschrieben werden. Das aufgenommene Progesteron wird zwar im Dünndarm sehr rasch resorbiert (Barfield et al. 1950), aber sofort bei der Leberpassage inaktiviert (Abbau zu Pregnandiol und Ausscheidung als Glucuronid, hauptsächlich über die Niere; Pearlman 1957, Mutschler 1973).

Im Vergleich dazu liegt die mit der kontrazeptiven Pille aufgenommene Gestagendosis im Milligramm-Bereich, wobei es sich um oral wirksame synthetische Verbindungen handelt. Der Abbau dieser Substanzen in der Leber geht im Vergleich zu Progesteron sehr viel langsamer vonstatten (Mutschler 1973).

6. Z U S A M M E N F A S S U N G

Ein radioimmunologisches Verfahren zur Bestimmung von Progesteron in der Milch wurde eingerichtet, das allen an die Zuverlässigkeit gestellten Ansprüchen genügte. 0,1 bis 0,2 ml Milch reichen für eine Analyse aus, 120 Einzelproben konnten innerhalb von 2 Tagen bestimmt werden. Ein Verfahren zur Konservierung der Milchproben für einen mehrtägigen Transport wurde ausgearbeitet.

Untersuchungen während des Zyklus und der Frühgravidität bei 10 Kühen ergaben eine hochsignifikante, gesicherte Korrelation für den Verlauf der Progesteronkonzentrationen in Blutplasma und Nachgemelk.

Als fast ausschließliche Produktionsstätte des in der Milch gemessenen Progesterons muß der Gelbkörper angenommen werden, insbesondere da auch nach dessen Erukleation in Blutplasma und Milch ein parallel verlaufender Abfall der Progesteronkonzentration zu beobachten ist.

Als sekundärer Faktor, der die Progesteronkonzentration in der Milch beeinflusst, konnte die Milchfettkonzentration ermittelt werden; mit Ablauf des Melkvorganges werden mit steigender Fettkonzentration steigende Progesteronkonzentrationen gemessen. Dementsprechend ergaben sich bei Vergleich der Relativwerte (Progesteronkonzentration in der Milch bezogen auf Milchfett) im Vergleich zu den Progesteronwerten im Plasma verbesserte Korrelationskoeffizienten. Die höheren Progesteronwerte in der Milch in der Phase einer aktiven Gelbkörpertätigkeit im Vergleich zu Blutplasma sind auf diese lipophilen Eigenschaften des Progesterons zurückzuführen.

Das Verfahren zur Bestimmung von Progesteron in der Milch erwies sich als geeignet zwischen dem 19. und 23. Tag nach der Insemination eine eventuell eingetretene Frühträchtigkeit zu diagnostizieren. Ein erster Feldversuch, in dem selektiv der 20. Tag "post inseminationem" für die Progesteronbestimmung in der Milch herausgesucht wurde, hat diese Aussagen bisher bestätigt; in 22 von 23 Fällen konnte anhand der Progesteronbestimmung in Milchproben die richtige Diagnose "trächtig" gestellt werden. Von Bedeutung erscheint die Tatsache, daß die Aussage "nicht trächtig" in jedem Fall mit der rektalen Trächtigkeitskontrolle übereinstimmte.

Ebenso erwies sich das Verfahren als geeignet, ovarielle Dysfunktionen aufzuzeigen.

Untersuchungen handelsüblicher Milchprodukte haben ergeben, daß in Abhängigkeit vom Fettgehalt die Konzentration zwischen 300 ng Progesteron pro g (Butter) und 1,5 ng Progesteron pro ml (Magermilch) schwanken kann.

S U M M A R Y

A radioimmunological method for the determination of progesterone in milk was developed which satisfied all demands put to the reliability. 0,1 to 0,2 ml milk are sufficient for one analysis, 120 separate samples could be determined within 2 days. A procedure for preservation of the milk samples for a transportation of several days has been worked out.

Examinations with 10 cows during the cycle and the early pregnancy proved a highly significant, certain correlation for the course of the progesterone concentrations in the blood plasma and the after milking.

The corpus luteum must be assumed as the nearly exclusive production place of progesterone measured in the milk, especially as a parallel passing decrease of the progesterone concentration after the enucleation of the corpus luteum is to be observed in the blood plasma and in the milk.

As secondary factor which influences the progesterone concentration in milk, the concentration of milk fat could be found; during the milking procedure with the increase of the fat concentration increasing progesterone concentrations can be measured. According to that a comparison with the relative values (progesterone concentration in milk referred to milk fat) in comparison with the progesterone values in the plasma showed improved correlation coefficients. The higher progesterone levels in milk in the phase of an active action of the corpus luteum in comparison with the blood plasma are to be attributed to this lipophilic characteristics of progesterone.

The method for the determination of progesterone in milk proved to be suitable to give a diagnosis for an eventually happened early pregnancy by determination of this hormone between the 19. and 23. day after the insemination. A first field trial, for which selectively the 20. day post inseminationem was chosen for the progesterone determination, has confirmed these statements up to now; in 22 of 23 cases could be given the right diagnosis "pregnant" by means of progesterone determination in milk samples. Important seems the fact that the diagnosis "non pregnant" in every case was in congruence with the later rectal control.

The same method proved to be suitable to show ovarian dysfunctions.

Research of commercial milk products have proved that the concentration can fluctuate between 300 ng progesterone per g (butter) and 1,5 ng progesterone per ml (skim milk) in relation with the fat contents.

7. TABELLENANHANG

Der Tabellenanhang (Seiten 123 - 149) wurde mit Genehmigung des Dekans der Tierärztlichen Fakultät der Universität München von der Drucklegung ausgenommen.

Ein ungekürztes Exemplar der Dissertation kann von Interessenten jederzeit in der Bibliothek der Tierärztlichen Fakultät der Universität München eingesehen werden.

S. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Abraham G.E. 1969
Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 β .
J. Clin. endocrinol. 29, 866
- Amoroso E.C. 1948
Ovarian activity in the pregnant mare.
Nature (Lond.) 161, 355
- Asdell S.A. 1964
Patterns of mammalian reproduction.
2nd. ed. Comstock Publ. Ass. Ithaca Cornell
University Press
- Balfour W.E., Comline R.S., Short R.V. 1957
Secretion of progesterone by the adrenal gland.
Nature (Lond.) 180, 1480
- Barfield W.E., Clark S., Brown N. 1950
Physiologic effectiveness of oral progesterone.
J. Clin. endocrinol. 10, 886
in: Handbuch der experimentellen Pharmakologie
Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York
- Basset J.M., Oxborrow T.J., Smith I.D., Thornburn G.D.
1969
The concentration of progesterone in the peripheral
plasma of the pregnant ewe.
J. Endocr. 45, 449
- Beiser S.M., Erlanger B.F., Agate F.J., Liebermann S.
1959
Antigenicity of steroid-protein conjugates.
Science 129, 564

- Billiar R.B., Tanaka Y., Knappenberger M., Hernandez R.,
Little B. 1969
Influence of transcortin and albumin on the rate of
reduction of progesterone by human placental 20a-
hydroxysteroid dehydrogenase.
Endocrinology 84, 1152
- Bowerman A.M., Melampy R.M. 1962
Progesterone and ⁴pregnen-20 β -o1-3-one in bovine
reproductive organs and body fluids.
Prog. Soc. exp. Biol. Med. 109, 45
- Butenandt A., Westphal U., Cobler H. 1934
Über einen Abbau des Stigmasterins zu Corpus-luteum-
wirksamen Stoffen, ein Beitrag zur Konstitution des
Corpus-luteum-Hormons.
Ber. deut. chem. Ges. 67, 1611
- Chiccini U. 1966
17 β -estradiol and estrone research in the blood and
milk of nymphomaniac cows.
Vet. Ital. 17, 9,590
- Clegg M.T., Boda T.M., Cole H.H. 1954
The endometrial cups and allantochorionic pouches
in the mare with emphasis on the source of equine
gonadotropin.
Endocrinology 54, 448
- Cole H.H., Goss H. 1943
The source of equine gonadotropin.
In: "Essay in biology"
Univ. Calif. Berkeley Calif. 107
- Cole H.H., Saunders F.J. 1935
Concentration of gonad stimulating hormone in blood
serum and of estrone in urine throughout pregnancy
in the mare.
Endocrinology 19, 199

Cowie A.T., Cox C.P., Folley S.J., Hosking Z.D.,
Naito M., Tindal J.S. 1965

The effect of the duration of treatments with
oestrogen and progesterone on the hormonal in-
duction of mammary growth and lactation in
the goat.

J. endocr. 32, 129

Cowie A.T., Knaggs G.S., Tindal J.S., Turvey A. 1968

The milking stimulus and mammary growth in the
goat.

J. endocr. 40, 243

Cowie A.T., Tindal J.S., Yokoyama A. 1966

The induction of mammary growth in the hypophys-
ectomized goat.

J. endocr. 34, 185

Darling J.A.B., Harkness R.A. 1973

A method for the group analysis of steroids in milk.
Acta endocr. 72, 391

Darling J.A.B., Kelly R.W., Laing A.H., Harkness R.A.
1972

The isolation and identification of progesterone
obtained from cows milk during pregnancy.

J. endocr. 54, 347

Deane H.W., Hay M.R., Moore R.M., Rowson L.E.A.,
Short R.V. 1966

Histochemical and electron microscopic features
of ovine corpora lutea in relation to progesterone
content.

2nd. Int. Congr. Hormonal Steroids Milan

Excerpta Medica Foundation

Int. Congr. Ser. 111, 257

- Denamur R., Martinet J. 1955
Effects de l'ovariectomie chez la brebis pendant
la gestation
C. R. Soc. Biol. (Paris) 149, 2105
- Diczfalusy E. 1952
Progesterone in human placental tissue.
Acta Endocrinol., (Copenh.) 10, 373
- Dorfman R.J., Ungar F. 1965
Metabolism of steroid hormones.
Academic Press, New York and London
- Edgar D.G., Ronaldson J.W. 1958
Blood levels of progesterone in the ewe.
J. endocr. 16, 378
- Eik-Nes K., Hall P.F. 1962
Isolation of dehydroepiandrosterone-¹⁴C from dogs
infused with cholestrol-4-¹⁴C by the spermatic
artery.
Prog. Soc. exp. Biol. Med. 111, 280
- Ender M.L. 1974
Radioimmunologische Progesteronbestimmungen im
peripheren Rinderblut: Methodische Entwicklungs-
arbeiten, Erhebungen bei physiologischen, patho-
physiologischen und biotechnisch beeinflussten
Situationen.
Dissertation agr. T.U.München, Weißenstephan
- Erb R.E., Randel R.D., Mellin T.N., Estergreen V.L.
1968
Urinary estrogen excretion rates during pregnancy
in the bovine
J. Dairy Sci. 51, 416

Erlanger B.F., Borek F., Beiser S.M., Liebermann S.
1957

Steroid-protein conjugates. 1. Preparation and characterisation of bovine serum albumin with testosterone and corticosterone.

J. Biol. Chem. 228, 713

Erlanger B.F., Borek F., Beiser S.M., Liebermann S.
1959

Steroid-protein conjugates. 2. Preparation and characterisation of conjugates of bovine serum albumin with progesterone, desoxycorticosterone and estrone.

J. Biol. Chem. 234, 1090

Estergreen V.L.Jr., Frost O.L., Gomes W.R., Erb R.E.,
Bullard J.F. 1967

Effect of ovariectomy on pregnancy maintenance and parturition in dairy cows.

J. Dairy Sci. 50, 1293

Ferin M., Zimmering P.E., Liebermann S., Vande Wiele R.L.
1968

Inactivation of the biological effects of exogenous and endogenous estrogens by antibodies to 17 β -estradiol. Endocrinology 83, 565

Ferrando R., Boisselot-Lefebvres J., Ratsimamanga A.R.
1960

Action des hormones du lait sur la gestation ainsi que sur la croissance du jeune rat et sur l'evolution ponderale de ses organes.

C. R. Soc. Biol. 154, 3, 579

Folley S.J. 1952

Lactation. In: "Marshalls Physiology of Reproduction". 3rd edn. ed. by Parkes A.S., vol. 2, chap. 20, London, Longmans, Green

- Folley S.J. 1956
The Physiology and Biochemistry of Lactation.
Edinburgh & London, Oliver & Boyd
- Fraenkel L., Cohn F. 1902
Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß
des Corpus luteum auf die Insertion des Eies.
Anat. Anz. 20, 294
- Goodfriend L., Leznoff A., Sehon A.H. 1961
Antibodies to estrone-protein conjugates.
3. Tissue localization of estrogens.
Can. J. Biochem. Physiol. 39, 967
- Goodfriend L., Sehon A.H. 1958
Preparation of the estrone-protein conjugates.
Can. J. Biochem. Physiol. 36, 1177
- Goodfriend L., Sehon A.H. 1960
Antigenicity of estrone-protein conjugates.
Nature (Lond.) 185, 764
- Goodfriend L., Sehon A.H. 1961 a
Antibodies to estrone-protein conjugates.
1. Immunochemical studies.
Can. J. Biochem. Physiol. 39, 941
- Goodfriend L., Sehon A.H. 1961 b
Antibodies to estrone-protein conjugates
2. Endocrinological studies.
Can. J. Biochem. Physiol. 39, 961
- Gorski I., Erb R.E., Dickson W.M. Butler H.C. 1958
Sources of progestins in the pregnant cow.
J. Dairy Sci. 41, 1380
- Günzler O. 1974
Korreferat zu Hoffmann B. und Hamburger R.:
Anwendung der Progesteronbestimmung in der Milch
zur Fertilitätskontrolle.
Tagung Phys. und Path. der Fortpfl. München Febr. 74
- Hansel W., Snook B.S. 1970
Pituitary ovarian relationships in the cow.
J. Dairy Sci. 53, 945

- Haraszti I., Feher T., Baksai E.H. 1968
Excretion of pregnandiol by cows during cycle.
Acta Vet. Acad. Sci. Hungaricae Tomus 18, 373
- Hayano M., Saba N., Dorfman R.J., Hechter O. 1956
Plasma progesterone levels in the goat and mammary uptake during pregnancy.
J. Physiol. (Lond.) 180, 10
- Heap R.B., Gwyn M., Laing J.A., Walters D.E. 1973
Pregnancy diagnosis in cows; changes in milk progesterone concentration during the oestrus cycle and pregnancy measured by a rapid radioimmunoassay.
J. agric. Sci. Camb. 81, 151
- Heap R.B., Linzell J.L. 1965
Plasma progesterone levels in the goat and mammary uptake during pregnancy.
J. Physiol. 216, 1213
- Heiss E. 1971
Photometrische Verfahren zur Bestimmung des Milchfettgehaltes.
Deutsche Milchwirtschaft, Heft 40, Beilage S. 10
- Höfer F. 1973
Wirkung eines synthetischen LH/FSH-Releasinghormons auf die Freisetzung des Luteinisierungshormons und auf die Ovarfunktion beim Rind.
Dissertation med.vet. Universität München
- Hoffmann B. 1971
Embryonaler Fruchttod bei einer Kuh im Anschluß an eine Nachbesamung - nachgewiesen mit Hilfe der Progesteronbestimmung im Blut.
Zuchthygiene 6, 134

- Hoffmann B. 1972
Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind;
Entwicklung von Meßverfahren und physiologische Daten.
Habilitationsschrift T.U. München, Weihenstephan
- Hoffmann B., Karg H. 1969
Determination of progesterone in bovine peripheral
plasma by competitive protein-binding.
3. Symposium über Proteinbindung von Steroidhormonen
in Leuven / Belgien
- Hoffmann B., Hamburger R. 1973
Progesteron in der Milch: Radioimmunologische Be-
stimmung, Beziehungen zur Gelbkörperfunktion und
Milchfettkonzentration.
Zuchthygiene 8, 154
- Hoffmann B., Kyrein J., Ender M.L. 1973
An efficient procedure for the determination of
progesterone by radioimmunoassay applied to bovine
peripheral plasma.
Hormone Res. 4, 302
- Ittrich G. 1960
Eine Methode zur chemischen Bestimmung von östrogenen
Hormonen in Blut, Milch und Kolostrum.
Z. physiol. Chem. 320, 103
- Jöchle W. 1957
Exogene und endogene Einflüsse auf Tragezeitdauer
und Geschlechtsverteilung der Nachkommen beim Pferd
Zuchthyg. Fortpfl.-Stör. Besam. Haustiere 1, 238
- Johannson I., Korkman N., Nelson N.I. 1952
Studies on udder evacuation in dairy cows. I and II.
Acta Agr. Scand. 3, 43,82

Johansson E.D.B. 1969

Progesterone levels in peripheral plasma during the luteal phase of the normal human menstrual cycle measured by a rapid competitive protein binding technique.

Acta endocr. (Copenh.) 61, 592

Johnson G.E., Challans J.S. 1930

Ovariectomy and corpus luteum extracts experiments in pregnant rats.

Anat. Rec. 47, 300

Jungblut P.W. 1971

Diskussion auf der Tagung: Methodische Schwierigkeiten der Proteinbindungsmethoden zur Bestimmung von Steroidhormonen.

Tagung, Schloß Auel 1. und 13. Nov. 1971

Jungblut P.W., Fischer I., Gaues J., Tykal P. 1970

Gewinnung, Charakterisierung und Anwendung von Östrogenbindenden Antikörpern.

Symp. Dtsch. Ges. Endocrinol. 16, 412

Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York

Karg H., Hoffmann B., Schams D. 1969

Verlauf der Blutspiegel an Progesteron, Luteinisierungshormon und Prolactin während des Zyklus bei einer Kuh.

Zuchthygiene 4, 149

Karg H., Hoffmann B., Schams D. 1970 a

Luteinizing hormone, prolactin and progesterone relationship in vivo (data from the cow).

Proc. 3rd Int. Congr., Hamburg, September 1970

Exc. Med. ICS No 219 Hormonal Steroids, S. 691

- Karg H., Schams D., Hoffmann B., Böhm S. 1970 b
Prolactin-, LH- und Progesteronblutspiegel bei
Kühen vor, während und nach der normalen bzw.
Corticoid-induzierten Geburt.
In: 16. Symp. Dtsch. Ges. f. Endokr.
Springer-Verlag Berlin S. 301
- Karlson P. 1970
Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 7.Auflage
- King L.F., Franks W.R. 1941
The conjugation of estrogens with protein.
J. Amer. chem. Soc. 63, 2042
- Kober S. 1931
Eine kolorimetrische Bestimmung des Brunsthormons
(Menformon).
Biochem. Z. 239, 209
- Kollich M.S., Gass G.H. 1971
Effect on male mice of a gonadotropic-like factor
found in milk.
Comp. Biochem. Physiol. 40 A, 367
- Koremann S.G. 1969
Comparative binding affinity of estrogens and
its relation to estrogenic potency.
Steroids 13, 163
- Kuss E., Goebel R. 1972 a
Synthese von Antigenen mit Östrogenen als
determinante Gruppen.
In: Fortschritte der klinischen Chemie, Enzyme
und Hormone.
Kaiser E. Ed.
Verlag der Wiener Medizinischen Akademie, S. 519

Kuss E., Goebel R. 1972 b

Determination of estrogens by radioimmunoassay
with antibodies to estrogen-C6-conjugates.

I. Synthesis of estrone, estradiol-17 β and
estriol-6-albumin conjugates

Steroids 19, 509

Kuss E., Goebel R. 1972 c

Determination of estrogens by radioimmunoassay
with antibodies to estrogen-C6-conjugates.

II. Synthesis of estradiol-17a-6-albumin conjugate.

Steroids 19, 737

Laing J.A., Heap R.B. 1971

The concentration of progesterone in the milk of
cows during the reproductive cycle.

Br. vet. J. 127, 19

Liebermann S., Erlanger B.F., Beiser S.M., Agate F.J.
1959

Steroid-protein conjugates: Their chemical,
immunochemical and endocrinological properties.

Rec. Prog. Horm. Res. 15, 165

Lindner H.R., Perel E., Friedlander A. 1970

Antibodies to estrogens.

Transaction 4th Meeting of International Study Group
for Steroid Hormones, Rome, Dec. 1969, Research on
Steroids. Finkelstein M., Conti G., Kloppe A.

Eds. Pergamon Press, Oxford 4, 197

Lindner H.R., Perel E., Friedlander A., Zeitlin A. 1972 a

Specificity of antibodies to ovarian hormones in
relation to the site of attachment of the steroid
hapten to the peptide carrier.

Steroids 19, 357

- Lindner H.R., Perel E., Friedlander A., Zeitlin A. 1972 b
Antibodies to steroids coupled to protein through
ring B and their use in the radioimmunoassay of
gonadal hormones.
J. endocr. 52, XVII
- Lindner H.R., Sass M.B., Morris B. 1964
Steroids in the ovarian lymph and blood of
conscious ewes.
J. endocr. 30, 361
- Linzell J.L., Heap R.B. 1968
A comparison of progesterone metabolism in the
pregnant sheep and goat; sources of production and
an estimation of uptake by some target organs.
J. endocr. 41, 433
- Lunaas T. 1963
Transfer of oestradiol-17 β to milk in cattle.
Nature 198, 288
- Lunaas T. 1964
Bovine colostrum levels of oestrone and oestradiols.
Acta vet. Scand. 5, 257
- Mc Cracken J.A. 1963
Plasma progesterone concentration after removal
of the corpus luteum in the cow.
Nature, 198, 4879,507
- Meites J., Webster H.D., Young F.W., Thorpe F.J., Hatch R.N.
1951
Effect of corpora lutea ablation and replacement
therapy with progesterone on gestation in goats.
J. Anim. Sci. 10, 411
- Du Mesnil du Buisson F., Dauzier L. 1957
Effect de l'hypophysectomie sur les corps jaunes
de lactation. Resultats preliminaires.
C. R. Acad. Sci. 257, 261

- Miller W.R., Turner C.W. 1963
Biosynthesis of steroids from pregnenolone-16-³H
by bovine ovarian tissue in vitro.
Steroids 2, 657
- Monval-Gerondeau M.L., Castanier M., Scholler R. 1970
Biocnemie endocrinienne. - Dosage des estrogènes
dans le lait de vache.
C. R. Acad. Sci. Paris 271, 2381
- Münch O. 1954
Die Ausscheidung von natürlichen Androgenen und
Östrogenen in der Milch.
Milchwissenschaft 9, 150
- Murphy B.E.P. 1967
Some studies on the protein binding of steroids
and their application to the routine micro and
ultramicro measurement of various steroids in
bodyfluids by competitive protein binding radio-
assay.
J. Clin. Endocrinol. 27, 973
- Murphy B.E.P., Engelberg W., Pattee C.J. 1963
Simple method for the determination of plasma
corticoids.
J. Clin. Endocrinol. 23, 293
- Mutschler E. 1973
Arzneimittelwirkungen
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH Stuttgart
- Neher G.M., Zarrow M.X. 1954
Concentration of progestin in the serum of the
non-pregnant, pregnant and post partum ewe.
J. endocr. 11, 323
- Neill J.D., Johansson E.D.B., Datta J.K., Knobil E. 1967
Relationship between the plasma levels of luteinizing
normone and progesterone during the normal menstrual
cycle.
J. Clin. Endocrinol. 27, 1167

Niswender G.D., Diekman M.A., Nett T.M., Akbar A.M.

1973

Realive blood flow to the ovaries of cycling and pregnant ewes.

Department of Physiology and Biophysics Colorado State University, Fort Collins

6th Annual Meeting of the Society for the study of reproduction.

Niswender G.D., Midgley A.R. Jr. 1970

Hapten-radioimmunoassay for steroid hormones.

In: Immunological methods in steroid determination.

Eds.: Peron F.G. & Caldwell B.V.

Appleton-Century-Crofts, New York p. 149

Paterson J.Y.F., Linzell J.L. 1971

The secretion of cortisol and its mammary uptake in the goat.

J. endocr. 50, 493

Pearlman W.H. 1957

(16-³H) Progesterone metabolism in advanced pregnancy and in oophorectomized - hysterectomized woman.

Biochem. J. 65, 7 P

In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie 22, 1, 131

Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York

Pearlman W.H., Cerceo E. 1952

The isolation of progesterone from human placenta.

J. biol. Chem. 198, 79

Pope G.S., Gupta S.K., Munro K.B. 1969

Progesterone levels in the systemic plasma of pregnant, cycling and ovariectomized cows.

J. Reprod. Fert. 20, 369

Pope G.S., Roy J.H.B. 1953

The oestrogenic activity of bovine colostrum.

Biochem. J. 53, 427

- Rapi G., Rossi R. 1955
Ricerca degli ormoni steroidi nel latte humano.
I. Indagini sul colostro.
Riv. Clin. Pediat. 56, 267
- Ratsimamanga A.R., Mouton M., Bein M. 1961
Mise en evidence d'hormones du type cortinique
dans le lait.
Ann. paediat. 196, 9
- Ratsimamanga A.R., Nigeon-Dureull M.M., Rabinowicz M.
1956
Presence d'hormone "type cortinique" dans le lait
de vache gravide.
C. R. Soc. Biol. 150, 2179
- Robinson R., Baker R.D., Anastassiadis P.A., Common R.H.
1970
Estrone concentrations in the peripheral blood of
pregnant cows.
J. Dairy Sci. 53, 1592
- Sachs H., Klopstock A. 1925
Die serologische Differenzierung von Lezithin und
Cholesterin.
Biochem. Z. 159, 491
- Schams D. 1972
Untersuchungen über Prolactin beim Rind.
Habilschrift T.U. München, Weihenstephan
- Shemesh M., Ayalon N., Lindner H.R. 1968
Early effect of conceptus on plasma progesterone
level in the cow.
J. Reprod. Fert. 15, 161
- Shimizu K., Dorfman R.I., Gut M. 1960
Isocaproic acid a metabolite of 20 α -hydroxycholesterol.
J. biol. Chem. 235, 25

- Short R.V. 1957
Progesterone and related steroids in the blood of domestic animals.
Ciba Found. Coll. Endocrinol. 11, 362
- Short R.V. 1960
Blood progesterone levels in relation to parturition.
J. Reprod. Fertil. 1, 61
- Short R.V., Moore N.M. 1959
Progesterone in blood. V. Progesterone and 20 α -hydroxy-pregn-4-en-3-one in the placenta and blood of ewes.
J. Endocrinol. 19, 288
- Slotin C.A., Heap R.B. 1970
Synthesis of progesterone by the mammary gland of the goat.
Nature, 225, No 5230, 385
- Spies H.G., Gier H.G., Wheat J.D. 1960
Maintenance of early pregnancy in ovariectomized gilts treated with gonadal hormones.
J. Anim. Sci. 19, 144
- Stabenfeldt G.H., Ewing L.L., Patton J.P., McDonald L.E. 1969
Gas-liquid chromatography for estimation of peripheral plasma progesterone in domestic animals.
J. endocr. 44, 23
- Steinbeck H. 1969
Die Wirkung der verschiedenen Gestagene auf Morphologie und Funktion der Milchdrüsen.
In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie 22,2, 341
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York
- Stormshak F., Erb R.E. 1961
Progestins in bovine corpora lutea, ovaries and adrenal during pregnancy
J. Dairy Sci. 44, 310

- Stott G.H., Robinson J.R. 1970
Plasma corticosteroids as indicators of gonadotropin secretion and infertility in stressed bovine.
J. Dairy Sci. 53, 652
- Sud S.C., Tucker H.A., Meites J. 1968
Estrogen-progesterone requirements for udder development in ovariectomized heifers.
J. Dairy Sci. 51, 210
- Sykes I.F., Wrenn T.R. 1951
Hormonal development of mammary tissue in dairy heifers.
J. Dairy Sci. 34, 1174
- Turner C.W. 1956
Estrogen content of milk of open and pregnant cows and effect of synthetic estrogen feeding.
J. Dairy Sci. 39, 925
- Turner C.W. 1966
General Endocrinology
4th Edition, Saunders W.B. Company Philadelphia, London
- Turner C.W., Yamamoto H., Ruppert H.L. Jr. 1956
The experimental induction of growth of the cows udder and the initiation of milk secretion.
J. Dairy Sci. 39, 1717
- Venning E. 1957
A secretion of various hormones and the activity of the adrenal cortex in pregnancy.
In: Gestation, J.M.Jr. Foundation, New York
- Vogt K., Karg H., Gass G.H. 1969
Nutritiv bedingte uterotrope und antiuterotrope Effekte bei juvenilen Mäusen
Z. f. Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde 25, 6, 333

- Wagner W.C., Strohbehn R.E., Harris P.A. 1972
ACTH, Corticoids and luteal function in heifers.
J. Anim. Sci. 35, 789
- Wagner W.C., Thompson F.N., Evans L.E., Molokwu E. 1974
Hormonal mechanism controlling parturition.
J. Anim. Sci. 38, (Suppl. 1) 39
- Weliky J., Engel L.L. 1962
17-hydroxy pregnenolone as a precursor for cortisol
Fed. Proc. 20, 179
- Westphal U. 1971
Effect of protein binding on hormonal activity of
steroids.
In: Steroid-Protein Interactions p. 434
Eds.: Gross F., Labhart A., Mann T., Samuels L.T.,
Zander J. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg -
New York
- Westphal U., Forbes T.R. 1963
Biological Inactivation of progesterone by binding
to alpha-1 acid glycoprotein (aerosomuroid).
Endocrinology 73, 504
- Williams W.F. 1962
Excretion of progesterone and its metabolites in milk,
urine and feces.
J. Dairy Sci. 45, 1541
- Yalow R.S., Berson S.A. 1959
Assay of plasma insulin in human subjects by
immunological methods.
Nature (Lond.) 184, 1648
- Yamamoto H., Turner C.W. 1955
Experimental udder growth and lactation in infertile
dairy heifers.
J. Dairy Sci. 38, 609

Zander J. 1960

Nachweis von Progesteron und 17a-Hydroxyprogesteron
in hyperplastischen Nebennieren bei androgenitalem
Syndrom.

Klin. Wchschr. 38, 5

Herrn Professor Dr. Heinrich Karg bin ich für die freundliche Überlassung des Themas, seine wissenschaftlichen Anregungen, sowie die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut zu großem Dank verpflichtet.

Besonders danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. B. Hoffmann für die methodische Einarbeitung sowie die zahlreichen Ratschläge und Diskussionen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern unseres Institutes und den Angestellten der Versuchstation Veitshof für die zahlreichen kleinen Hilfestellungen recht herzlich bedanken.

Die Untersuchungen wurden im Rahmen des Schwerpunktprogrammes "Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung" der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Die Hormonbestimmungen in handelsüblichen Milchprodukten wurde von den Freunden und Förderern der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft finanziell unterstützt.

Während des Zeitraumes der Anfertigung der Dissertation wurde ich durch ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz finanziell unterstützt, wofür ich mich an dieser Stelle herzlich bedanke.

9. L E B E N S L A U F

des Tierarztes Rainer Hamburger
wohnhaft in 8055 Franzheim 45

Am 21. September 1948 wurde ich als Sohn des Tierheilkundigen und Landwirts Hermann Hamburger und seiner Frau Erika in Freising geboren.

Vom Jahre 1954 an besuchte ich die Volksschule in Franzheim. 1958 trat ich in das Josef-Hofmiller Gymnasium in Freising ein, wo ich 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Im November 1967 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium der Tiermedizin, das ich 1972 mit dem Staatsexamen abschloß.

Am 29. November 1972 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt.

Im selben Monat begann ich in Weihenstephan am Institut für Physiologie der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft der Technischen Universität München mit der vorgelegten Arbeit, die im Januar 1974 abgeschlossen wurde.

